

KARIN FAUST SOUZA

**INFLUÊNCIA DA CLOREXIDINA NA RESISTÊNCIA DE
UNIÃO DE SISTEMAS ADESIVOS EM DENTINA DECÍDUA: ESTUDO *IN VITRO***

Tese de Doutorado

Florianópolis
2011

KARIN FAUST SOUZA

**INFLUÊNCIA DA CLOREXIDINA NA RESISTÊNCIA DE
UNIÃO DE SISTEMAS ADESIVOS EM DENTINA DECÍDUA: ESTUDO *IN VITRO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Odontologia - Área de Concentração Odontopediatria.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Izabel Cristina Santos Almeida
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Gondo Machado

Florianópolis
2011

Souza, Karin Faust, 1980-
S71 Influência da clorexidina na resistência de união de sistemas adesivos em dentina decídua : estudo *in vitro* / Karin Faust Souza ; orientadora Izabel Cristina Santos Almeida ; co-orientadora Renata Gondo Machado. -- 2011.
92 f. : il. color. ; 21 cm

Tese (doutorado em Odontologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011
Inclui bibliografias

1. Odontopediatria. 2. Adesivos dentinários. 3. Dentina.
I. Almeida, Izabel Cristina Santos. II. Machado, Renata Gondo.
III. Título.

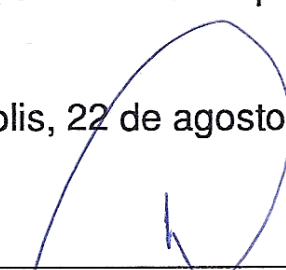
CDD (21. ed.) 617.645

KARIN FAUST SOUZA

**INFLUÊNCIA DA CLOREXIDINA NA RESISTÊNCIA DE UNIÃO
DE SISTEMAS ADESIVOS EM DENTINA DECÍDUA: ESTUDO
IN VITRO**

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do título de Doutora em Odontologia, área de concentração Odontopediatria, e aprovada em sua forma final pelo Curso de Pós-Graduação em Odontologia.

Florianópolis, 22 de agosto de 2011.




Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Coordenador do Curso


BANCA EXAMINADORA:



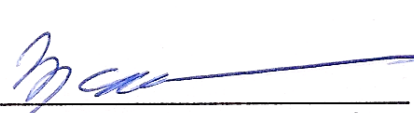
Prof.^a. Dr.^a. Izabel Cristina Santos Almeida
Orientadora



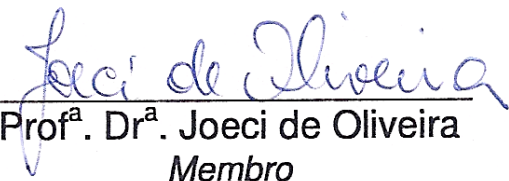
Prof. Dr. Mário Alexandre
Coelho Sinhoretí
Membro



Prof. Dr. Marcelo Tomás
de Oliveira
Membro



Prof. Dr. Mauro Amaral
Caldeira de Andrada
Membro



Prof.^a. Dr.^a. Joeci de Oliveira
Membro

Dedico esta tese,

A **Deus**, por todas as minhas conquistas, por estar sempre presente em minha vida, por iluminar meu caminho, "Se Deus é por nós, quem será contra nós?" RM 8:31

Aos meus pais, **Wanderlei e Janete**, minha eterna gratidão, por todo amor, dedicação e incentivo. Muito obrigada pelas oportunidades que me ofereceram. Amo vocês...

Ao meu esposo, **Jaime**, por todo amor, paciência e dedicação. Pelo apoio nos momentos de dúvida e dificuldades, por compreender minha ausência. Te amo...

Ao meu filho, **Jaiminho**, por todo amor e compreensão. Por me ensinar a ser mãe e me proporcionar tantas alegrias. Te amo muito, filho.

Agradecimentos Especiais

À amiga **Carla Miranda**, pela inestimável ajuda, pelo incentivo constante, pelo grande carinho e amizade.

À minha **mãe**, a **Kelly**, a **Daida** e a **Cilinha** por cuidarem tão bem do **Jaiminho** sempre que estive ausente.

Um agradecimento mais que especial a **Daida**, por tudo o que faz pela nossa família...

Muito obrigada!

Agradecimentos

À minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Izabel Cristina Santos Almeida**, pela confiança, amizade, disponibilidade e ensinamentos recebidos.

À minha co-orientadora, **Prof^a. Dr^a. Renata Gondo Machado**, pela atenção, amizade, precioso auxílio e conhecimentos transmitidos.

Aos professores, **Membros da Comissão Avaliadora** desta tese, por aceitar o convite para contribuir no aprimoramento do meu trabalho.

Ao ex-Diretor do Centro de Ciências da Saúde, **Prof. Dr. Cleo Nunes de Souza**, pelo apoio constante, carinho e amizade.

À Sub-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFSC, **Prof^a. Dr^a. Daniela Lemos Carcereri**, pela confiança e incentivo.

Aos **Professores do Curso de Graduação e do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFSC**, por minha formação.

Especialmente, aos **Professores da Disciplina de Odontopediatria**, pela amizade, pelas oportunidades e ensinamentos.

Aos **Professores das Disciplinas de Dentística e de Materiais Dentários**, pelo acolhimento e incentivo.

Aos amigos do Doutorado **Alexandre, Carla, Catherine, Helen, Maria Helena, Rui e Thais** pela amizade e bons momentos compartilhados.

Especialmente à **Cath**, por dividir os momentos de alegria e ansiedade desta fase.

A todos os **colegas da Graduação e Pós-Graduação**, especialmente àqueles que convivi no Laboratório de Pesquisa, pelo companheirismo e favores prestados.

Aos amigos **Eduardo, Bianca e Mabel**, pelo apoio e palavras de carinho.

A todos os **colegas da Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL**, pela amizade e incentivo.

Especialmente às amigas **Prof^a. Sandra Teixeira Bittencourt e Prof^a. Andresa Nolla de Matos Furtado**, pela amizade, carinho, incentivo e apoio ao longo desses anos.

Aos estagiários, **Mislene, Ricardo, Felipe e Julia**, pela paciência e precioso auxílio durante o uso do microscópio eletrônico de varredura.

Ao funcionário **Lauro** do Laboratório de Pesquisa, pelo auxílio na fase experimental dessa pesquisa.

Às secretárias, **Ana, Ivalda e Bete** pelo carinho, amizade e atenção constante.

À **Farmácia de Manipulação Flor de Anis**, em nome de **Dayane e Marcelo**, pela atenção e disposição em ajudar com as formulações das soluções utilizadas.

Aos meus irmãos, **Gunter, Kelly e Richard**, meus sobrinhos **Sofia, André e Isabelle**, meus cunhados **Mirela, Raiana, Cláudia e Daniel** e meus sogros **Jaime e Cecília**, pelo carinho e incentivo em todos os momentos.

A **Ana** e a **Maria** pelo precioso auxílio e carinho.

A **Aline, Carol, Cris, Elina, Fabíola, Gabi, Mara, Marco e Vinicius** pela compreensão e apoio constante.

Aos amigos **Tássia e Marquinhos, e sua filha Duda**, e aos amigos **Ricardo e Andréa** pelo prazeroso convívio e pelas palavras de incentivo e amizade.

A todos que se fizeram presentes, através de palavras e pensamentos e que, de alguma forma, me ajudaram nesta conquista.

SOUZA, Karin Faust. **Influência da clorexidina na resistência de união de sistemas adesivos em dentina decídua: estudo *in vitro***. 2011. 92f. Tese (Doutorado em Odontologia - Área de Concentração Odontopediatria) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

Este estudo *in vitro* foi realizado com o objetivo de avaliar a influência da aplicação de solução de clorexidina 2% na resistência de união à microtração imediata e após termociclagem de dois sistemas adesivos (condicionamento ácido total de 2 passos X autocondicionante de 2 passos) aplicados em dentina hígida de dentes decíduos, assim como, ilustrar a formação de *tags* e camada híbrida na interface dentina-adesivo de cada grupo avaliado. Molares decíduos hígidos foram selecionados e preparados para obtenção de superfícies oclusais planas, e distribuídos aleatoriamente em 5 grupos (n=12): Adper Single Bond 2 (SB); Clearfil SE Bond (CF); Adper Single Bond 2 com clorexidina aplicada após condicionamento ácido (SB+CHX); Clearfil SE Bond com clorexidina aplicada antes do *primer* (CF+CHX antes), e depois do *primer* (CF+CHX depois). Os adesivos e a resina composta Z350XT foram aplicados de acordo com os fabricantes. A CHX 2% foi aplicada com pincel descartável por 60s. Posteriormente, os dentes restaurados foram armazenados em água destilada (37°C/24h), e subdivididos (n=6) para análise imediata (IM) e após termociclagem (TC). Os espécimes foram seccionados, obtendo-se palitos (0,8mm²) para o ensaio de microtração (0,5mm/min-Instron). Os valores foram submetidos a ANOVA fatorial e Tukey (p<0,05). Uma amostra representativa de cada grupo foi preparada para análise da interface dentina-adesivo em MEV. Os valores médios obtidos no teste de microtração IM foram [MPa(DP)]: CF-45,44(4,77); CF+CHX antes-44,56(10,65); CF+CHX depois-40,92(10,61); SB+CHX-39,13(10,25); SB-38,10(7,01) e TC foram: CF-43,20(29,91); SB+CHX-39,86(7,59); CF+CHX depois-39,75(12,42); SB-37,33(11,79); CF+CHX antes-32,82(14,86). Baseado nos dados obtidos, pôde-se concluir que a clorexidina não influenciou de modo estatisticamente significativa a resistência de união imediata e após termociclagem dos sistemas adesivos estudados em dentina decídua, mesmo que a análise das interfaces dentina-adesivo tenha demonstrado padrão diferenciado quando a solução de clorexidina 2% foi aplicada com o sistema adesivo autocondicionante.

Palavras-chave: Clorexidina. Dente decíduo. Dentina. Adesivos dentinários. Odontopediatria.

SOUZA, Karin Faust. **Influence of chlorhexidine on the bond strength of adhesive systems in primary dentin: *in vitro* study.** 2011. 92p. Thesis (PhD in Dentistry - Pediatric Dentistry) - Federal University of Santa Catarina, Florianópolis.

ABSTRACT

This *in vitro* study was accomplished to evaluate the influence of the application of 2% chlorhexidine solution on the immediate and after thermocycling microtensile bond strength of two adhesive systems (2-step total etching and 2-step self-etching) in primary dentin, as well as, to illustrate the formation of tags and hybrid layer in resin-dentin interface of each group assessed. Caries free primary molars were selected and prepared to obtain flat occlusal surfaces in dentin, and they were randomly divided into 5 groups (n=12): Adper Single Bond 2 (SB); Clearfil SE Bond (CF); Adper Single Bond 2 + chlorhexidine applied after acid etching (SB+CHX); Clearfil SE Bond + chlorhexidine applied before primer (CF+CHX before), and applied after primer (CF+CHX after). The adhesives and composite resin (Z350XT) were applied according to manufacturers, and 2% chlorhexidine was applied for 60s. Next, the teeth were stored in distilled water at (37°C/24h) and then subdivided (n=6) for analysis immediately (IM) and after thermocycling (TC). The specimens were sectioned and 0.8mm² resin-dentin sticks were tested under microtensile at 0.5mm/min (Instron). The values were submitted to factorial ANOVA and Tukey's test (p<0.05). A representative sample of each group was prepared for analysis of resin-dentin interface by SEM. The mean values obtained from the IM μ TBS test were [MPa(SD)]: CF-45.44(4.77); CF+CHX before-44.56(10.65); CF+CHX after-40.92(10.61); SB+CHX-39.13(10.25); SB-38.10(7.01) and TC were: CF-43.20(29.91); SB+CHX-39.86(7.59); CF+CHX after-39.75(12.42); SB-37.33(11.79); CF+CHX before-32.82(14.86). Based on the obtained data, it was concluded that 2% chlorhexidine solution had no statistically significant influence on the bond strength of adhesive systems in primary dentin either immediately or after thermocycling, even though the analysis of resin-dentin interfaces have shown different pattern when 2% chlorhexidine was applied to the self-etching system adhesives.

Keywords: Chlorhexidine. Primary tooth. Dentin. Dentin-bonding agents. Pediatric dentistry.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

±: mais ou menos

°C: grau Celsius

10-MDP: 10-metacrilóiloxidecil diidrogenofosfato

Bis-GMA: bisfenolglícidil metacrilato

CHX: clorexidina

DP: desvio padrão

HCl: ácido clorídrico

HEMA: 2-hidroxietil metacrilato

HMDS: hexametildisilazano

h: hora

IM: imediata/o

ISO: *International Organization for Standardization*

LED: *light emitting diode* (diodo emissor de luz)

MEV: microscopia eletrônica de varredura

min: minuto

mm/min: milímetro por minuto

mm: milímetro

mm²: milímetro quadrado

MMPs: *matrix metalloproteinases* (metaloproteinases da matriz)

mol/Litro: mol por Litro

MPa: megapascal

mW/cm²: miliwatts por centímetro quadrado

N: Newton

n ou **n°**: número

NaOCl: hipoclorito de sódio

pH: potencial do Hidrogênio

PVC: policloreto de vinila

rpm: rotação por minuto

s: segundo

SiC: carbetto de silício

TC: após termociclagem

X: vezes

µm: micrometro

µTBS: *microtensile bond strength* (resistência à microtração)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 ARTIGO	27
2.1 Versão em português	27
2.2 Versão em inglês	45
REFERÊNCIAS	62
APÊNDICES	69
A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	70
B - Metodologia expandida	71
C - Análise estatística	79
ANEXOS	82
A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – UFSC	83
B - Normas para publicação do artigo	84

1 INTRODUÇÃO

Avanços na odontologia restauradora têm promovido uma expressiva melhora das resinas compostas e dos sistemas adesivos, sendo evidente a evolução dos conhecimentos sobre os mecanismos de adesão, que têm como objetivos garantir não somente o estabelecimento, mas especialmente a durabilidade da união aos tecidos dentários (DE MUNCK et al., 2005; BRESHI et al., 2008; PERDIGÃO, 2010).

Entretanto, enquanto um selamento hermético pode ser alcançado entre o esmalte dental e muitos sistemas adesivos atuais, na interface de união resina-dentina, este selamento ainda é um grande desafio (PASHLEY; CARVALHO, 1997; VAN MEERBEEK et al., 1998; PERDIGÃO, 2010).

A adesão à dentina é crítica devido às características dinâmicas do próprio substrato, demonstradas pela sua complexidade estrutural, presença de umidade e heterogeneidade morfológica regional (PASHLEY; CARVALHO, 1997; VAN MEERBEEK et al., 2003; PERDIGÃO, 2010). A dentina é composta, em peso, por aproximadamente 70% de matéria inorgânica, 18% de matéria orgânica (principalmente colágeno tipo I) e 12% de água. Porém, em função da sua mineralização progressiva devido a estímulos fisiológicos e patológicos, há uma tendência dessa composição variar com o passar do tempo (TEN CATE, 2001).

Enquanto o esmalte é composto principalmente de hidroxiapatita, característica que facilita a técnica adesiva, a dentina é um tecido formado por uma malha densa de canalículos, chamados túbulos dentinários (PASHLEY; CARVALHO, 1997). Estes, contêm no seu interior os prolongamentos odontoblásticos, responsáveis pela formação de dentina e pela comunicação entre a dentina e a polpa, como também o fluido tissular, que está relacionado com a sensibilidade dentinária e é responsável pela sua umidade típica (BRÄNNSTRÖM; LINDEN; JOHNSON, 1968; PASHLEY et al., 1993).

Outra característica importante da dentina é a presença da lama dentinária que se forma na superfície após instrumentação e que oblitera a entrada dos túbulos. De acordo com Pashley e Carvalho (1997), devido à adesão limitada da lama dentinária unindo-se à dentina, as opções para aumentar a resistência de união seriam a remoção completa da lama dentinária ou o desenvolvimento de agentes que penetrem através dela na matriz de dentina subjacente, sendo que ambos os procedimentos têm sido utilizados com sucesso.

Na técnica convencional, a adesão à dentina acontece pelo mecanismo da hibridização, no qual a lama dentinária é removida pelo ácido e uma fina trama de fibrilas colágenas é exposta e infiltrada pelos monômeros do *primer* e posteriormente pelo adesivo, formando a camada híbrida (NAKABAYASHI; KOJIMA; MASUHARA, 1982).

No entanto, algumas dificuldades existem para a formação de uma camada híbrida ideal. Após o condicionamento ácido, a dentina é lavada, e a rede de fibrilas colágenas expostas pela desmineralização superficial é suspensa pela existência de água em seu interior. Se a dentina condicionada for seca, as fibrilas colágenas podem colapsar, e a infiltração do sistema adesivo será prejudicada, sendo então sugerida a manutenção da dentina úmida. Por outro lado, a água presente no interior da rede de fibrilas colágenas precisa ser volatilizada durante a aplicação do sistema adesivo para permitir que os monômeros infiltrem. Dessa forma, a manutenção da umidade dentinária é crítica, pois fica evidente a dificuldade de padronização (NAKABAYASHI; SAIMI, 1996).

Os sistemas adesivos atuais são classificados de acordo com a maneira que interagem com a lama dentinária em: sistemas adesivos de condicionamento ácido total e autocondicionantes (PERDIGÃO, 2010).

A técnica em que se utiliza o condicionamento ácido total pode ser realizada em 3 ou 2 passos. Na primeira, o ácido é aplicado na estrutura dentária, sendo posteriormente feita a aplicação do *primer* e na sequência o adesivo resinoso (3 passos). No processo simplificado (2 passos), *primer* e adesivo são apresentados em um único frasco (VAN MEERBEEK et al., 1998).

Com a tendência em simplificar o procedimento de adesão, somada à dificuldade da padronização da umidade da dentina e à necessidade de evitar áreas não infiltradas pelo adesivo, fatos que comprovadamente interferem no sucesso da adesão, é que surgiram os sistemas autocondicionantes (VAN MEERBEEK et al., 1998; VAN MEERBEEK et al., 2003; DE MUNCK et al., 2005; BRESCHI et al., 2008; PERDIGÃO, 2010).

Os adesivos autocondicionantes fundamentam-se na remoção parcial da lama dentinária e desmineralização da dentina subjacente, sendo que a penetração dos monômeros adesivos ocorre simultaneamente ao condicionamento, com pouca ou nenhuma diferença entre a área condicionada e a área de infiltração do adesivo (WATANABE; NAKABAYASHI; PASHLEY, 1994; NAKABAYASHI; SAIMI, 1996; HAYAKAWA; KIKUTAKE; NEMOTO, 1998). Esses sistemas podem ser apresentados na forma de *primer* autocondicionante e adesivo resinoso (2 passos), ou sistemas que apresentam o *primer* autocondicionante e o adesivo em um único frasco (1 passo) (VAN MEERBEEK et al., 1998).

Segundo De Munck et al. (2005), os adesivos de condicionamento ácido total de 3 passos ainda têm apresentado melhor performance em pesquisas laboratoriais e clínicas, sendo que somente os adesivos autocondicionantes de 2 passos chegaram próximo desse padrão, e têm benefícios adicionais como facilidade de manipulação e redução da sensibilidade técnica. Tais vantagens facilitam e beneficiam o procedimento restaurador em crianças considerando que, embora o dente decíduo seja um dente temporário, a durabilidade das restaurações é bastante relevante e possibilita que o mesmo cumpra seu ciclo biológico.

Estudos *in vitro*, que avaliaram a adesão em dentina decídua, têm demonstrado que a efetividade dos sistemas adesivos autocondicionantes de 2 passos, comparada aos de condicionamento ácido total se equivale (SENAWONGSE et al., 2004; SOARES et al., 2005; MIRANDA et al., 2006; SANABE et al., 2009; MIRANDA et al., 2010). Estudos longitudinais têm confirmado o bom desempenho clínico desses materiais em dentes decíduos com acompanhamento de até 4 anos (CASAGRANDE et al., 2006; CASAGRANDE et al., 2008; CASAGRANDE et al., 2010).

Por outro lado, observa-se que os sistemas adesivos simplificados (condicionamento ácido total de 2 passos e autocondicionantes de 1 passo) não têm necessariamente melhorado a efetividade da adesão (VAN MEERBEEK et al., 2003; DE MUNCK et al., 2005; PEUMANS et al., 2005; BRESCHI et al., 2008). Uma das principais justificativas apontadas para esta dificuldade ocorre devido à natureza hidrofílica desses materiais, sendo que os mesmos atuam como uma membrana semi-permeável que atrai água, fato que leva à degradação mais rápida da interface adesiva (DE MUNCK et al., 2003; DE MUNCK et al., 2005; PEUMANS et al., 2005; ZHANG; KERN, 2009).

Para Van Meerbeek et al. (1998), as maiores razões para a limitação da longevidade das restaurações adesivas estão relacionadas com a deterioração da adesão entre dentina e adesivo com o passar do tempo. Breschi et al. (2008) ressaltaram estudos que demonstraram uma drástica redução da resistência de união, frequentemente acompanhada por alterações morfológicas, que revelam a desnaturação parcial ou completa de seus constituintes, ou seja, dos sistemas adesivos e da dentina modificada pelo procedimento adesivo.

A deterioração da interface dentina-resina pode resultar da degradação hidrolítica, que pode ocorrer mesmo na ausência de *gaps* interfaciais. A presença de espaços internos na camada híbrida ou nas camadas do adesivo (SANO, 2006) é explicada pelo fenômeno da nanoinfiltração, descrito pela primeira vez por Sano e colaboradores (SANO et al., 1995a; SANO et al., 1995b). A degradação hidrolítica ocorre na presença desses espaços, que são preenchidos por água e que favorecem a movimentação de fluido na interface adesivo-dentina (WANG; SPENCER, 2002). Esta sorção de água inicialmente tem efeito plastificador e altera parcialmente a energia de coesão das cadeias poliméricas (FERRACANE, 2006). A água, contudo, não atua apenas como agente plastificador visto que, com o passar do tempo, pode provocar hidrólise de suas moléculas e degradação estrutural, ou seja, em hidrólise dos constituintes da interface, principalmente dos monômeros adesivos (SANTERRE; SHAGII; LEUNG, 2001; FERRACANE, 2006).

Aliado a isto, o colágeno da dentina, quando desprotegido, também pode ser hidrolisado com o tempo (TAY; PASHLEY; YOSHIYAMA, 2002; SANO, 2006; VAN MEERBEEK, 2007). A matriz orgânica dentinária é constituída principalmente por fibrilas colágenas, e na superfície de suas fibrilas estão distribuídas algumas proteínas não colagenosas, tais como fosforina, sialoproteína dentinária e glicosaminoglicanas. Essas proteínas interagem com o colágeno a partir de ligações que estabelecem com moléculas de água fortemente adsorvidas ao colágeno, formando uma rede de polímeros hidrofílicos. Essa rede polimérica pode absorver água, porém se apresenta insolúvel devido à presença de ligações peptídicas (NAKABAYASHI; SAIMI, 1996). Estudos indicam que na presença de ácidos produzidos por bactérias, ou quando é realizado o condicionamento ácido, parte do conteúdo mineral é dissolvido expondo as fibrilas de colágeno e demais proteínas, dessa forma, ocorre a desnaturação parcial das fibrilas de colágeno (TJÄDERHANE et al., 1998). Em seguida, acontece a ação proteolítica dos componentes da própria matriz de dentina desmineralizada ou da dentina adjacente à camada híbrida através, por exemplo, da proteólise do colágeno, devido à reativação das metaloproteinases da matriz (MMPs), enzimas não-colanogênicas que constituem parte da matriz extracelular da dentina (PASHLEY et al., 2004; HEBLING et al., 2005; CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006; BRACKETT et al., 2007; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; ZHANG; KERN, 2009; MOON; WEAVER; BROOKS, 2010).

Estudos demonstraram que os sistemas adesivos (tanto os de condicionamento ácido total como os autocondicionantes) não conseguem recobrir totalmente as fibrilas colágenas expostas após o processo de desmineralização (WANG; SPENCER, 2003; WANG; SPENCER, 2004). Isto resulta em fibrilas colágenas desprotegidas e vulneráveis no interior da camada híbrida, o que as tornam susceptíveis ao processo de degradação proteolítica pelas MMPs (PASHLEY et al., 2004; MAZZONI et al., 2006; BRACKETT et al., 2007; CARRILHO et al., 2007b; BRACKETT et al., 2009; ZHANG; KERN, 2009; MOON; WEAVER; BROOKS, 2010). Estas endopeptidases estão presentes na saliva e na matriz extracelular de células humanas que apresentam atividade metabólica de remodelação e degradação de vários tipos de colágeno (TJÄDERHANE et al., 1998). A matriz dentinária contém muitas proteínas não-colanogênicas nas quais estão incluídos alguns tipos de metaloproteinases: MMP-2, MMP-8, MMP-9 dentre outras collagenases (TJÄDERHANE et al., 1998; CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006; MAZZONI et al., 2006). Em função do processo de mineralização da dentina, estas enzimas, cálcio e zinco dependentes, ficam em estado latente na matriz extracelular, mas podem ser ativadas se a dentina for desmineralizada (TJÄDERHANE et al., 1998).

A partir deste conhecimento, vários estudos têm demonstrado que a aplicação de clorexidina (CHX) em conjunto com o procedimento adesivo tem efeito inibidor das

MMPs, sendo esta etapa recomendada como forma de diminuir a degradação da união ao longo do tempo, aumentando a longevidade da restauração (PASHLEY et al., 2004; HEBLING et al., 2005; CARRILHO et al., 2007b; KOSE et al., 2010).

A CHX é um agente antibacteriano de amplo espectro que tem sido utilizado para limpeza de preparos cavitários, atuando como desinfetante sobre esmalte ou dentina, antes do procedimento restaurador (GENDRON et al., 1999; CASTRO et al., 2003; VIEIRA; DA SILVA JR., 2003; ERSIN et al., 2009).

Atualmente, também é demonstrado seu efeito na inibição de pelo menos 3 tipos de metaloproteinases: MMP-2, MMP-8 e MMP-9 (GENDRON et al., 1999; CARRILHO et al., 2007a). Gendron et al. (1999) sugeriram que a CHX interage com os grupos sulfidril e/ou cisteína presentes nos sítios ativos de algumas MMPs (MMP-8), ou ainda que possa quelar o cálcio presente nos tecidos, inativando outras MMPs (MMP-2 e MMP-9) e inibindo a atividade colagenolítica dessas enzimas. O efeito da CHX tem sido demonstrado em sistemas adesivos de condicionamento ácido total, tanto em estudos *in vitro* (CARRILHO et al., 2007a; SOARES et al., 2008; BRESCHI et al., 2009; CAMPOS et al., 2009a; CAMPOS et al., 2009b; KOMORI et al., 2009; LOGUERCIO et al., 2009; STANISLAWCZUK et al., 2009; BRESCHI et al., 2010; CHANG; SHIN, 2010; DALLI et al., 2010; MANFRO et al., 2010; RICCI et al., 2010c; BRACKETT et al., 2011; SANABE; COSTA; HEBLING, 2011; STANISLAWCZUK; REIS; LOGUERCIO et al., 2011), quanto *in vivo* (HEBLING et al., 2005; BRACKETT et al., 2007; CARRILHO et al., 2007b; BRACKETT et al., 2009; RICCI et al., 2010b; BRACKETT et al., 2011), com evidências de que seu uso após o condicionamento ácido da dentina e previamente ao uso dos adesivos convencionais não afeta a resistência de união imediata e pode desacelerar o processo de degradação das interfaces adesivas com o passar do tempo.

Todavia, existe controvérsia em relação ao seu uso com adesivos autocondicionantes (CAMPOS et al., 2009a; CAMPOS et al., 2009b; ZHOU et al., 2009; DALLI et al., 2010; DE MUNCK et al., 2009; SANABE, 2009; DE MUNCK et al., 2010; MOBARAK; EL-KORASHY; PASHLEY, 2010; ZHOU et al., 2010;). Alguns estudos, quando avaliaram a influência da CHX, utilizaram-na previamente à aplicação do *primer* ácido do sistema autocondicionante de 2 passos, e compararam seus resultados com a ação da CHX aplicada após o condicionamento ácido dos sistemas adesivos convencionais (CAMPOS et al., 2009b; SANABE, 2009; MOBARAK; EL-KORASHY; PASHLEY, 2010) e observaram semelhança entre os resultados.

Pelo exposto, existe dúvida sobre em que momento a CHX deve ser utilizada na técnica autocondicionante: antes ou após o *primer* ácido. Se a função é inibir a ação das MMPs para reduzir a degradação das fibrilas colágenas expostas após o condicionamento ácido, é questionável se o uso da CHX antes do *primer* dos sistemas autocondicionantes teria esta ação ou estaria exercendo apenas o papel de desinfetante da cavidade. Sabe-se que o condicionamento ácido e a infiltração dos monômeros adesivos nos sistemas autocondicionantes acontece de forma simultânea (WATANABE; NAKABAYASHI; PASLEY, 1994; NAKABAYASHI; SAIMI, 1996). Contudo, estudos com nanoinfiltração demonstraram que existe uma incompleta infiltração do adesivo deixando as fibrilas colágenas expostas (WANG, SPENCER, 2003; WANG, SPENCER, 2004). Seguindo este raciocínio, a aplicação da CHX após o *primer* talvez fosse mais indicada para interferir no processo de degradação (OSORIO et al., 2011), visto que as fibrilas colágenas poderiam estar expostas.

Assim, faz-se necessário um maior número de pesquisas que avaliem a influência da CHX na adesão em dentina decídua. Embora vários estudos tenham demonstrado a ação da CHX, utilizada após o condicionamento ácido, como inibidor de MMPs, a maioria têm sido realizada em dentes permanentes, sendo que aqueles realizados em dentes decíduos avaliaram sua ação somente em sistemas adesivos de

condicionamento ácido total (HEBLING et al., 2005; AZEVEDO et al., 2010; MANFRO et al., 2010; RICCI et al., 2010b ; RICCI et al., 2010c).

Hebling et al. (2005) realizaram estudo que avaliou, através de microscopia eletrônica de transmissão, a degradação *in vivo* da adesão em restaurações classe I em pares contralaterais de molares decíduos utilizando o adesivo Single Bond. Concluíram que a autodestruição de matrizes de colágeno ocorre rapidamente após um período de 6 meses de função intraoral, e pode ser detida com o uso de CHX 2% aplicada durante 30s como um inibidor de MMPs. Além disso, observaram que as camadas híbridas nos grupos tratados com CHX exibiram integridade estrutural normal das redes de colágeno, enquanto que camadas híbridas anormais foram observadas nos grupos controle, com progressiva desintegração da rede de fibrilas.

Azevedo et al. (2010) analisaram a influência da CHX 2% por 30s na qualidade da camada híbrida formada com o adesivo Single Bond em dentes decíduos, através de microscopia eletrônica de varredura. Concluíram que o protocolo clínico-restaurador com aplicação de CHX não interferiu na qualidade da camada híbrida, podendo ser indicado para aumentar a sobrevida das restaurações por meio da inibição das MMPs.

Manfro et al. (2010) avaliaram o efeito do uso de CHX 0,5% e 2% por 30s na resistência de união imediata do sistema adesivo Adper Single Bond 2 à dentina decídua, utilizando o teste de resistência à microtração. Observaram que as concentrações de 0,5% e 2% apresentaram comportamentos similares e não causaram efeitos adversos na resistência de união.

Ricci et al. (2010c) realizaram pesquisa *in vitro* que avaliou a influência do substrato, dentes decíduos e permanentes, e da aplicação de CHX 2% por 60s na resistência de união imediata, através do ensaio mecânico de microtração, utilizando os sistemas adesivos: Prime & Bond NT, Adper Single Bond e Excite DSC. Os resultados mostraram que a aplicação de CHX afetou positivamente ($p < 0,05$) a resistência de união produzida pelos adesivos Prime & Bond NT e Adper Single Bond, enquanto nenhum efeito foi demonstrado pelo Excite DSC.

Em estudo *in vivo*, Ricci et al. (2010b) selecionaram 13 voluntários de 8 a 11 anos de idade, que apresentavam no mínimo dois molares decíduos contralaterais com lesão de cárie oclusal, sendo que os dentes foram designados aleatoriamente aos grupos controle (água destilada por 60s) e experimental (CHX 2% por 60s). Após procedimento restaurador utilizando o adesivo Prime & Bond NT, os dentes foram preparados para o teste de microtração e agrupados de acordo com os períodos em que permaneceram em função na cavidade oral como: até 30 dias, de 1 a 5, de 10 a 12 e de 18 a 20 meses. Redução significativa da resistência de união foi observada no grupo controle nos primeiros meses (1 a 5 meses) enquanto o mesmo foi observado para o grupo experimental apenas a partir do período de 10 a 12 meses. Concluíram que o uso da CHX, como coadjuvante no processo de adesão à dentina, foi capaz de desacelerar a degradação da interface adesiva nos primeiros meses após o procedimento restaurador.

De acordo com a literatura, um dos parâmetros para avaliação da qualidade da adesão utilizados com frequência é a resistência de união, que constitui um importante indicador da efetividade dos sistemas adesivos (PASHLEY et al., 1999; VAN MEERBEEK et al., 2003; DE MUNCK et al., 2005). Estudos laboratoriais e pré-clínicos constituem ferramenta obrigatória e permitem pesquisas com variáveis isoladas ou não, e que irão influenciar na efetividade e confiabilidade do material testado (VAN MEERBEEK et al., 2003). A avaliação da resistência adesiva por intermédio do teste de microtração vem sendo amplamente divulgada na literatura também em dentes decíduos (BURROW; NOPNAKEEPONG; PHRUKKANON, 2002; CASAGRANDE et al., 2005; NAKORNCHAI et al., 2005; SOARES et al., 2005; CASAGRANDE et al., 2006; MARQUEZAN et al., 2008; ERSIN et al., 2009; MIRANDA et al., 2010; OSORIO

et al., 2010; RICCI et al., 2010a; RICCI et al., 2010b; RICCI et al., 2010c), tendo como vantagem a obtenção de vários espécimes a partir de um único dente e permitindo que a avaliação da resistência adesiva seja realizada em áreas extremamente pequenas ($< 1\text{mm}^2$) (PASHLEY et al., 1999), possibilitando a avaliação de sítios específicos especialmente em substratos clinicamente relevantes, como dentina esclerótica ou afetada por cárie (PASHLEY et al., 1999; VAN MEERBEEK et al., 2003; NAKORNCHAI et al., 2005).

Além disso, o preparo das amostras para o ensaio de microtração permite avaliar, em laboratório, a performance dos sistemas adesivos de forma imediata e após relativo envelhecimento, através do armazenamento em água, da ciclagem térmica ou de cargas oclusais (DE MUNCK et al., 2005). A termociclagem é um processo *in vitro* utilizado para submeter uma restauração aos limites de temperatura semelhantes aos experimentados na cavidade oral, o que pode produzir potenciais efeitos negativos devido aos diferentes coeficientes de expansão térmica entre o dente e o material restaurador (KORKMAZ et al., 2010).

Diante dessas considerações, pesquisas relacionadas à eficácia da adesão de sistemas autocondicionantes em dentes decíduos são importantes, visto que envolvem um procedimento mais simples e rápido, com menor suscetibilidade às variáveis técnicas. Essas características tornam esses adesivos interessantes para a Odontopediatria, considerando que nesta especialidade, a simplificação da técnica é um recurso extra desejado, diminuindo o tempo de atendimento do paciente infantil (SENAWONGSE et al., 2004).

Ainda, observa-se a necessidade de informações no que diz respeito à utilização de clorexidina em dentes decíduos como possibilidade de aumentar a longevidade das restaurações. Por esta razão, idealizou-se este estudo com o objetivo de avaliar a influência da aplicação de clorexidina 2% na resistência de união imediata e após termociclagem de 2 sistemas adesivos (condicionamento ácido total de 2 passos X autocondicionante de 2 passos) em dentina hígida de dentes decíduos.

2 ARTIGO

2.1 Versão em português

Influência da clorexidina na resistência de união de sistemas adesivos em dentina decídua: estudo *in vitro*

Souza KF; Gondo R; Miranda C; Almeida ICS

Palavras-chave: clorexidina, dente decíduo, dentina, adesivos dentinários, odontopediatria.

Autora para correspondência: Karin Faust Souza
Av. Rodovalho, 649, ap. 301 – Vila Moema
Tubarão – SC – Brasil
CEP: 88705-090
Fone: +55 (0) 48 3052-3993
e-mail: karinfaust@hotmail.com

Resumo

Objetivo: Avaliar a influência da aplicação de solução de clorexidina 2% na resistência de união de 2 diferentes sistemas adesivos em dentina decídua.

Materiais e métodos: Superfícies oclusais planas de dentina em molares decíduos hígidos foram preparadas e distribuídas aleatoriamente em 5 grupos (n=12): Adper Single Bond 2 (SB); Clearfil SE Bond (CF); Adper Single Bond 2 + clorexidina aplicada após condicionamento ácido (SB+CHX); Clearfil SE Bond + clorexidina aplicada antes do *primer* (CF+CHX antes) e depois do *primer* (CF+CHX depois). Os adesivos e a resina composta (Z350XT) foram aplicados de acordo com os fabricantes, e a clorexidina 2% foi aplicada durante 60s. Posteriormente foram subdivididos (n=6) para análise imediata (IM) e após termociclagem (TC). Os espécimes foram seccionados, obtendo-se palitos (0,8mm²) para o ensaio de microtração (0,5mm/min - Instron). Os valores foram submetidos a ANOVA fatorial e Tukey (p<0,05).

Resultados: Os valores médios obtidos no teste de microtração IM foram [MPa(DP)]: CF-45,44(4,77); CF+CHX antes-44,56(10,65); CF+CHX depois-40,92(10,61); SB+CHX-39,13(10,25); SB-38,10(7,01) e TC foram: CF-43,20(29,91); SB+CHX-39,86(7,59); CF+CHX depois-39,75(12,42); SB-37,33(11,79); CF+CHX antes-32,82(14,86).

Conclusão: A solução de clorexidina 2% não influenciou de modo estatisticamente significativa a resistência adesiva imediata e após termociclagem dos sistemas adesivos avaliados em dentina decídua.

Introdução

O efeito da clorexidina (CHX) na inibição das metaloproteinases da matriz (MMPs) de dentina tem sido estudado com sistemas adesivos de condicionamento ácido total tanto em dentes permanentes¹⁻⁸ como em dentes decíduos.^{3,5,6,9,10} Há evidências de que sua utilização após o condicionamento ácido da dentina e previamente ao uso dos adesivos não afeta a resistência de união imediata e pode desacelerar o processo de degradação das interfaces adesivas.

Quanto aos adesivos autocondicionantes, observaram-se pesquisas em dentes permanentes nas quais a CHX foi utilizada previamente à aplicação do *primer* ácido do sistema autocondicionante de 2 passos, e os resultados foram comparados com a ação da CHX aplicada após o condicionamento ácido dos sistemas adesivos convencionais.^{11,12} Porém, se o objetivo do uso da CHX for aumentar a longevidade das restaurações, pela inibição da ação das MMPs e consequente redução da degradação das fibrilas colágenas expostas devido à incompleta infiltração do adesivo,^{13,14} talvez fosse mais indicada a aplicação da CHX após o *primer* dos sistemas autocondicionantes.¹⁵

Diante dessas considerações, realizou-se esta pesquisa com objetivo de avaliar a influência da clorexidina na resistência de união de dois diferentes sistemas adesivos (CHX após condicionamento ácido total X CHX antes e após o *primer* do autocondicionante) em dentina decídua, uma vez que estudos relacionados a estes materiais, principalmente aos autocondicionantes em dentes decíduos são importantes, por representarem uma alternativa aos sistemas adesivos de condicionamento ácido total, visto que envolvem um procedimento mais simples e rápido, características que tornam esses adesivos interessantes para a Odontopediatria. Este estudo *in vitro* foi realizado com objetivo de avaliar a influência da aplicação de solução de clorexidina 2% na resistência de união imediata e após termociclagem de 2 sistemas adesivos - condicionamento ácido total de 2 passos X autocondicionante de 2 passos - em dentina hígida de dentes decíduos e ilustrar, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), a formação de *tags* de resina e da camada híbrida.

Materiais e métodos

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina - Brasil / Protocolo nº 931/10.

Seleção e preparo dos dentes

Sessenta molares decíduos humanos com superfície oclusal hígida foram selecionados após limpeza com curetas, escovas Robinson e água e avaliação com lupa estereoscópica (10X).

As raízes, quando presentes, foram desgastadas até aproximadamente 2mm aquém da junção cimento-esmalte, com lixa de carbetto de silício (SiC) nº220 (3M do Brasil, Sumaré, SP, Brasil), em politriz (Panambra Struers DP-10, Panambra, São Paulo, Brasil), sob refrigeração com água. Na seqüência, a câmara pulpar foi preenchida com resina composta Renamel, cor azul (Cosmedent, Chicago, IL, EUA), para diferenciar da área de adesão principal e reforçar os dentes durante o seccionamento dos corpos de prova.¹⁶ Para isso, foi realizado o condicionamento com ácido fosfórico 35% (Ultra-Etch, Ultradent, South Jordan, UT, EUA) e aplicado o sistema adesivo Adper Scotchbond Multi-Purpose (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) segundo a recomendação do fabricante.

Após, aplicou-se resina composta Filtek Z250 (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) para

que cada dente ficasse aproximadamente 3mm maior no seu longo eixo, para reproduzir parte da raiz e, desta forma, facilitar os demais procedimentos.

Na sequência, as coroas dos dentes foram isoladas com cera utilidade para inclusão da porção radicular em resina acrílica, em tubos de PVC (25 x 20mm) isolados com vaselina. Concluída a polimerização, os espécimes foram removidos dos tubos de PVC e a cera utilidade foi removida com gaze das superfícies oclusais.

Posteriormente, a superfície oclusal foi desgastada com lixa de SiC n°220, sob refrigeração com água, para exposição da dentina. Para confirmar a ausência de esmalte, os espécimes foram secos com jato de ar e examinados com lupa estereoscópica (10X). Após, foi realizada a regularização da superfície e padronização da lama dentinária, com auxílio de lixas de SiC n°400 e 600, em politriz, sob refrigeração com água, em 4 diferentes posições, durante 10s cada, totalizando 40s por espécime.

Procedimento adesivo

Os grupos estão delineados na Tabela 1.

A aplicação da solução de digluconato de clorexidina 2% (FGM, Joinville, SC, Brasil - lote: 120710) foi feita com pincel descartável por 60s e, posteriormente, realizou-se secagem com papel absorvente.

Após a aplicação dos sistemas adesivos e fotopolimerização, a resina composta Filtek Z350XT (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA), cor A2D, foi inserida em 3 incrementos, de aproximadamente 1,5mm de espessura, sendo cada incremento fotopolimerizado por 40s. A fotopolimerização foi realizada com aparelho LED (Ultra Lume, Ultradent, South Jordan, UT, EUA), com intensidade de luz de 1095mW/cm², aferida de 5 em 5 dentes com radiômetro (SDS-Kerr 910726, Kerr Corporation, CT, EUA).

Os espécimes foram armazenados em água destilada a 37°C, em estufa microbiológica, por 24h, e subdivididos aleatoriamente em 2 grupos (n=6): análise imediata (IM) e análise após termociclagem (TC).

A ciclagem térmica foi realizada de acordo com as recomendações da ISO 11405 standard (2003).¹⁷ Os espécimes foram alocados em invólucros de tecido sintético (5530, Lupo, Araraquara, SP, Brasil) de diferentes cores, para identificação dos grupos. Foram colocados no recipiente móvel de uma máquina específica (Ética Equipamento Científicos S/A, São Paulo, SP, Brasil), alternando-se em banhos de 5°C (±2) e 55°C (±2), totalizando 500 ciclos,¹⁸ e permaneceram 30s em cada banho, com um tempo de transferência de 3s, perfazendo um ciclo em 66s.

Subseqüentemente à armazenagem por 24h ou à termociclagem, os espécimes foram fixados, individualmente, com adesivo a base de cianoacrilato (Super Bonder, Henkel Loctite Adesivos Ltda., Itapevi, SP, Brasil), em suporte acrílico. Depois foram cortados (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) em secções longitudinais (perpendicularmente à interface adesiva), com disco diamantado com 0,3mm de espessura (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), com velocidade de 250rpm, sob refrigeração com água.

Foram feitas secções no sentido mésio-distal, para obtenção dos espécimes. Depois aplicou-se cera pegajosa em toda a sua extensão e confeccionadas as secções no sentido vestibulo-lingual, para obtenção de palitos com área de secção transversal de aproximadamente 0,8mm².

Resistência de união pelo teste de microtração

A área de secção transversal de cada palito foi mensurada com paquímetro digital (Modelo 727, Starett, Itu, SP, Brasil), e fixados, com adesivo de cianoacrilato, em

dispositivos de Geraldelli. que foram adaptados em uma máquina de ensaios (Modelo 4444, Instron Corp., Canton, MA, EUA), que foi movimentada no sentido de tração com velocidade de 0,5mm/min., para fraturar os corpos de prova. Os valores de resistência adesiva foram calculados em megapascals (MPa) dividindo-se a carga aplicada (N) pela área de secção transversal do palito (mm²):

$$\mu\text{TBS}(\text{MPa}) = \text{carga aplicada}(\text{N}) / \text{área}(\text{mm}^2)$$

Avaliação do padrão de fratura após o teste de microtração

O tipo de falha de cada corpo de prova foi avaliado em microscópio óptico (LEICA DM 4000M, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Alemanha) em aumento de 50X, sendo classificadas como segue – adaptado de Sardella et al. (2005):¹⁹

- Coesiva: a) Resina Composta: fratura na resina composta;
b) Dentina: fratura na estrutura da dentina.
- Adesiva: fratura entre adesivo e dentina.
- Mista: fratura dos tipos coesiva e adesiva.

Análise da interface dentina/adesivo em MEV

Uma amostra representativa das fatias externas, obtidas pela primeira orientação de corte durante o preparo para o teste de microtração, foi preparada para análise da interface dentina-adesivo em microscopia eletrônica de varredura (MEV).²⁰

Análise estatística

Os padrões de fratura foram avaliados de forma descritiva e foram considerados para análise estatística, os valores observados nos corpos de prova que apresentaram fraturas classificadas como adesivas, por representarem uma mensuração da resistência adesiva.²¹

As médias das áreas de secção transversal dos corpos de prova incluídos na análise, foram calculadas para cada dente e submetidas à ANOVA fatorial e Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para o teste de microtração, calculou-se as médias para cada dente em cada grupo experimental. Os valores de resistência de união foram submetidos à ANOVA fatorial (tratamento x adesivo x tempo) e Teste de Tukey ($p < 0,05$). E os resultados foram calculados considerando-se o dente como unidade experimental, para que as variáveis internas na dentina de cada elemento dental não interferissem nas avaliações.²²

Resultados

Resistência de união pelo teste de microtração

Os valores médios da área de secção transversal dos corpos de prova e a análise estatística (ANOVA fatorial e Tukey), estão na Tabela 2, assim como o resultado da análise estatística (ANOVA fatorial e Tukey).

A Tabela 3 apresenta a quantidade de falhas prematuras ocorridas para cada sistema adesivo utilizado. O resultado da análise descritiva do padrão de fratura ocorrido em cada condição experimental está representado no gráfico de barras (Figura 1).

Os valores médios obtidos no teste de microtração, e a análise estatística

(ANOVA fatorial e Tukey), são apresentados na Tabela 4.

Análise da interface dentina/adensivo

As figuras 2 a 6 ilustram as interfaces adesivas observadas em MEV.

Discussão

De acordo com a metodologia utilizada, os sistemas adesivos Adper Single Bond 2 e Clearfil SE Bond apresentaram desempenho semelhante em relação à resistência de união obtida em dentina hígida de dentes decíduos, independente do tratamento aplicado (com e sem CHX) e do tempo de realização do ensaio mecânico de microtração (imediato e após termociclagem).

Quanto ao desempenho em relação à resistência de união imediata, pesquisas têm demonstrado desempenhos igualmente satisfatórios e similares entre os sistemas adesivos de 2 passos,^{16,23-25} o que corrobora com os resultados encontrados nesta pesquisa. Outros estudos observaram superioridade de resistência de união imediata do Adper Single Bond 2¹⁹ e do Clearfil SE Bond.²⁶ Divergência possivelmente relacionada a variações em etapas das metodologias empregadas.

Estudos realizados *in vivo* demonstraram que a utilização da CHX como coadjuvante no processo de adesão à dentina reduz significativamente a velocidade de degradação das interfaces adesivas tanto em dentes decíduos^{3,9} e em dentes permanentes.^{1,2} Efeito possivelmente relacionado à sua capacidade de agir como inibidor de MMPs, ação semelhante aos de inibidores naturais dessas enzimas.²⁷

Quando a CHX foi utilizada após o condicionamento ácido e antes da aplicação do adesivo Adper Single Bond 2, não se observou diferença estatisticamente significativa na resistência de união imediata, resultado que está em acordo com os de estudos de Ricci et al. (2010)⁶ e Manfro et al. (2010)⁵ também realizados com dentes decíduos, e semelhantes a pesquisas em dentes permanentes^{4,7,8} e bovinos.¹¹ Observação importante, visto que, estudos sugerem que a CHX pode ser utilizada com este sistema adesivo, após o condicionamento ácido, com intuito de aumentar a longevidade da adesão tanto em dentes decíduos,^{3,6,9} como em permanentes.^{1,2,4,6,8}

Em relação à avaliação da influência da CHX no sistema autocondicionante Clearfil SE Bond, existe dúvida sobre em que momento a CHX deve ser utilizada na técnica autocondicionante: antes ou após o *primer* ácido, então esta última condição também foi avaliada. Osorio et al. (2011)¹⁵ observaram diminuição da degradação das fibras colágenas em aproximadamente 30% quando a CHX foi utilizada após a aplicação do *primer* do Clearfil SE Bond. No presente estudo, os resultados mostraram semelhança entre os valores de resistência de união imediata entre as duas condições. Não foi observada diferença significativa nos valores de resistência de união imediata quando a CHX foi aplicada antes do *primer* ácido, corroborando com a pesquisa de Mobarak; El-Korashy; Pashley (2010),¹² que avaliaram o mesmo momento da aplicação da clorexidina em dentes permanentes humanos. Entretanto, Campos et al. (2009)¹¹ observaram diminuição da resistência de união imediata em estudo com dentes permanentes bovinos, em estudo que avaliou o efeito da CHX aplicada, também, antes do *primer* ácido do adesivo Clearfil SE Bond. Os autores sugerem que podem haver interações entre a CHX e os componentes do adesivo, talvez diminuindo a sua molhabilidade e o nível de condicionamento da dentina.

Nesta pesquisa, a resistência de união não foi influenciada pela termociclagem. Ainda, como foram utilizadas amostras de dentina planificadas, a interface adesiva ficou protegida por uma margem de adesão em esmalte, fator que pode ter também

influenciado neste resultado. Esta situação contudo, parece representar de forma mais adequada a condição existente no meio bucal, como descrito por De Munck et al. (2003).²⁸

Pela análise dos padrões da interface dentina-adesivo em MEV, foi possível identificar nos grupos SB, CF e SB + CHX, com e sem termociclagem, a formação de longos *tags* de resina, alguns com ramificações laterais, muitos dos quais fraturados devido à perda do suporte dentinário, uma vez que a dentina foi removida pelo tratamento com ácido clorídrico e hipoclorito de sódio durante o preparo das amostras. A afirmação de que a espessura da camada híbrida e a formação de longos *tags* de resina não indicam efetividade de adesão¹⁹ está em acordo com o presente estudo, visto que, as diferenças visualizadas no MEV, se contrapõem aos valores elevados de resistência de união observados dos em todos os grupos, corroborando também com os achados de Senawongse et al. (2004)²³ e Miranda et al. (2006).²⁴

A aplicação de CHX na técnica de condicionamento ácido total pareceu não influenciar na formação de *tags* de resina e da camada híbrida nesta pesquisa, assim como relatado na literatura.^{6,10} Observou-se, entretanto, padrão diferente quando a CHX foi aplicada com o sistema autocondicionante, tanto antes como após o *primer* ácido, sugerindo uma interferência negativa na infiltração do *primer* ácido ou do adesivo, respectivamente.

A utilização da CHX é interessante do ponto de vista clínico, com intuito de aumentar a longevidade das restaurações, por já fazer parte da rotina de alguns clínicos, utilizada para limpeza de preparos cavitários,²⁹ mas poderia ser vista com restrição pelos odontopediatras por ser mais um passo no procedimento restaurador. Para os sistemas autocondicionantes, tem sido sugerida a incorporação de CHX ao *primer* ácido³⁰ e, em relação à técnica de condicionamento ácido total, foi indicada a utilização de condicionador ácido contendo CHX.^{4,8}

Diante dessas considerações, ressalta-se que novas pesquisas são necessárias para avaliar a influência da CHX na longevidade de restaurações de dentes decíduos com ambos sistemas adesivos de 2 passos, de condicionamento ácido total e autocondicionante.

Conclusão

- Em dentina hígida de dentes decíduos, a resistência de união à microtração imediata e após termociclagem, dos 2 sistemas adesivos avaliados, Adper Single Bond 2 e Clearfil SE Bond, foram similares entre si e não foi influenciada pela aplicação de clorexidina 2%;
- O momento da aplicação da clorexidina (antes ou após o *primer*) na técnica autocondicionante não provocou diferença na resistência de união;
- A análise das interfaces dentina-adesivo mostrou padrão diferente dos demais grupos quando a clorexidina foi aplicada com o sistema adesivo autocondicionante, entretanto não houve diferença na resistência de união.

Bullet Points

- O que este artigo acrescenta: (*What this paper adds*)
Este artigo contribui para o esclarecimento sobre o uso da clorexidina para aumentar a longevidade das restaurações em dentes decíduos.
- Por que este artigo é importante para os odontopediatras: (*Why this paper is important to paediatric dentists*)
Os resultados deste trabalho sugerem que os sistemas adesivos de

condicionamento ácido total e autocondicionante de 2 passos apresentam a mesma efetividade em dentina decídua e que a clorexidina não afetou a resistência de união dos sistemas adesivos avaliados, podendo ser uma alternativa para aumentar a longevidade das restaurações.

Referências

1. Brackett WW, Tay FR, Brackett MG, Dib A, Sword RJ, Pashley DH. The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo. *Oper Dent* 2007; 32: 107-111.
2. Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjaderhane L et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res* 2007; 86: 529- 533.
3. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res* 2005; 84: 741-746.
4. Stanislawczuk R, Amaral RC, Grande CZ, Gagler D, Reis A, Loguercio AD. Chlorhexidine-containing acid conditioner preserves the longevity of resin–dentin bonds. *Oper Dent* 2009; 34: 483-492.
5. Manfro ARG, Reis A, Loguercio AD, Imparato JCP, Raggio DP. Effect of chlorhexidine on the bond strength to dentin in primary teeth. *Rev Odonto Ciênc* 2010; 25: 88-91.
6. Ricci HA, Sanabe ME, Costa CA, Hebling J. Effect of chlorhexidine on bond strength of two-step etch-and-rinse adhesive systems to dentin of primary and permanent teeth. *Am J Dent* 2010; 23: 128-132.
7. Sanabe ME, Costa CA, Hebling J. Exposed collagen in aged resin-dentin bonds produced on sound and caries-affected dentin in the presence of chlorhexidine. *J Adhes Dent* 2011; 13: 117-124.
8. Stanislawczuk R, Reis A, Loguercio AD. A 2-year in vitro evaluation of a chlorhexidine-containing acid on the durability of resin–dentin interfaces. *J Dent* 2011; 39: 40-47.
9. Ricci HA, Sanabe ME, de Souza Costa CA, Pashley DH; Hebling J. Chlorhexidine increases the longevity of *in vivo* resin–dentin bonds. *Eur J Oral Sci* 2010; 118: 411-416.
10. Azevedo TD, Bezerra AC, Faber J, de Toledo OA. Evaluation of chlorhexidine on the quality of the hybrid layer in noncarious primary teeth: an *in vitro* study. *J Dent Child* 2010; 77: 25-31.
11. Campos EA, Correr GM, Leonardi DP, Pizzatto E, Morais EC. Influence of chlorhexidine concentration on microtensile bond strength of contemporary adhesive systems. *Braz Oral Res* 2009; 23: 340-345.
12. Mobarak EH, El-Korashy DI, Pashley DH. Effect of chlorhexidine concentrations on micro-shear bond strength of self-etch adhesive to normal and caries-affected dentin. *Am J Dent* 2010; 23: 217-222.

13. Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res* 2003; 82: 141-145.
14. Wang Y, Spencer P. Physicochemical interactions at the interfaces between self-etch adhesive systems and dentine. *J Dent* 2004; 32: 567-579.
15. Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Ruiz-Requena ME, Pashley D, Tay F et al. Effect of dentin etching and chlorhexidine application on metalloproteinase-mediated collagen degradation. *Eur J Oral Sci* 2011; 119: 79-85.
16. Miranda C, Prates LHM, Chain MC, Vieira RS. Microtensile bond strength of 4 dentin adhesives to primary dentin. *J Dent Child* 2010; 77: 126-134.
17. International Organization for Standardization. ISO 11405: Dental materials - Testing of adhesion to tooth structure. 2 ed. Geneva, 2003.
18. Korkmaz Y, Gurgan S, Firat E, Nathanson D. Effect of adhesives and thermocycling on the shear bond strength of a nano-composite to coronal and root dentin. *Oper Dent* 2010; 35: 522-529.
19. Sardella TN, de Castro FL, Sanabe ME, Hebling J. Shortening of primary dentin etching time and its implication on bond strength. *J Dent* 2005; 33: 355-362.
20. Kaaden C, Schmalz G, Powers JM. Morphological characterization of the resin-dentin interface in primary teeth. *Clin Oral Invest* 2003; 7: 235-240.
21. De Andrade AM, Moura SK, Reis A, Loguercio AD, Garcia EJ, Grande RH. Evaluating resin-enamel bonds by microshear and microtensile bond strength tests: effects of composite resin. *J Appl Oral Sci* 2010; 18: 591-598.
22. Loguercio AD, Barroso LP, Grande RHM, Reis A. Comparison of intra- and intertooth resin-dentin bond strength variability. *J Adhes Dent* 2005; 7: 151-158.
23. Senawongse P, Harnirattisai C, Shimada Y, Tagami J. Effective bond strength of current adhesive systems on deciduous and permanent dentin. *Oper Dent* 2004; 29: 196-202.
24. Miranda C, Prates LHM, Vieira RS, Calvo MCM. Shear bond strength of different adhesives systems to primary dentin and enamel. *J Clin Pediat Dent* 2006; 31: 35-40.
25. Sanabe ME, Kantovitz KR, Costa CA, Hebling J. Effect of acid etching time on the degradation of resin-dentin bonds in primary teeth. *Am J Dent* 2009; 22: 37-42.
26. Nakornchai S, Harnirattisai C, Surarit R, Thiradilok S. Microtensile bond strength of a total-etching versus self-etching adhesive to caries-affected and intact dentin in primary teeth. *JADA* 2005; 136: 477-483.
27. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004; 83: 216-221.

28. De Munk J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res* 2003; 82: 136-140.
29. Ersin NK, Candan U, Aykut A, Eronat C, Belli S. No adverse effect to bonding following caries disinfection with chlorhexidine, *J Dent Child* 2009; 76: 20-27.
30. Zhou J, Tan J, Yang X, Cheng C, Wang X, Chen L. Effect of chlorhexidine application in a self-etching adhesive on the immediate resin-dentin bond strength. *J Adhes Dent* 2010, 12: 27-31.

Tabelas

Tabela 1. Sistemas adesivos testados: composição, pH, grupos, modo de aplicação e número do lote.

Sistema adesivo	Composição [†]	pH	Grupos	Modo de aplicação [§]	Nº do lote
Adper Single Bond 2	Água, etanol, HEMA, Bis-GMA, dimetacrilatos, sistemas fotoiniciadores, metacrilato funcional de copolímeros do ácido poliacrílico, poli-itacônico e polialquenóico.	0,6* (ácido)	SB	a; b; c; d; e; f	BPBR
			SB + CHX	a; b; c; g; c; d; e; f	
Clearfil SE Bond	<i>Primer</i> : 10-MDP, HEMA, dimetacrilato hidrofílico, di-canforquinona, N-N-dietanol P-toluidina, água. <i>Adesivo</i> : MDP, HEMA, Bis-GMA, dimetacrilato hidrofóbico, di-canforquinona, N-N-dietanol P-toluidina, sílica coloidal silanizada.	2,0* (<i>primer</i>)	CF	h; i; e; f	<i>primer</i> : 00954A <i>adesivo</i> : 01415A
			CF + CHX antes	g; c; h; i; e; f	
			CF + CHX depois	h; g; c; i; e; f	

*Informações do fabricante

[†]Abreviações: HEMA: 2-hidroxietil metacrilato, Bis-GMA: bisfenolglicidil metacrilato, 10-MDP: 10-metacrilóiloxidecil diidrogenofosfato.[§]*Modo de aplicação*: a) condicionamento - ácido fosfórico 35% (15s); b) enxágüe (10s); c) secagem com papel absorvente - sem dessecar a dentina; d) aplicação do adesivo em duas camadas consecutivas; e) aplicação de jato de ar sobre o adesivo (2-5s); f) fotoativação (10s); g) aplicação de digluconato de clorexidina 2% (60s); h) aplicação do *primer* (20s) e aplicar jato de ar; i) aplicação do adesivo.

Tabela 2. Valores médios da área de secção transversal dos corpos de prova (palitos) analisados.

Grupos	Tempo			
	Imediato (IM)		Termociclagem (TC)	
	n	Média (DP) [†]	n	Média (DP) [†]
SB	6	0,84 (0,09) Aa	5	0,82 (0,06) Aa
CF	6	0,76 (0,07) Aa	3	0,83 (0,05) Aa
SB + CHX	6	0,77 (0,05) Aa	6	0,85 (0,03) Aa
CF + CHX antes	6	0,79 (0,04) Aa	5	0,83 (0,04) Aa
CF + CHX depois	6	0,82 (0,08) Aa	6	0,82 (0,06) Aa

[†]Letras maiúsculas iguais em uma mesma coluna e letras minúsculas iguais em uma mesma linha indicam semelhança estatística, (ANOVA fatorial e Tukey, p<0,05)

n = nº de dentes

DP = desvio padrão

Tabela 3. Quantidade de falhas prematuras (%) ocorridas para cada sistema adesivo, por palito.

Grupos	Tempo			
	Imediato (IM)		Termociclagem (TC)	
	Total n	Falha prematura n (%)	Total n	Falha prematura n (%)
SB	99	0 (0)	72	2 (2,78)
CF	92	0 (0)	37	0 (0)
SB + CHX	80	1 (1,25)	106	4 (3,77)
CF + CHX antes	87	0 (0)	63	5 (7,94)
CF + CHX depois	79	0 (0)	81	0 (0)

n: nº de palitos

Tabela 4. Valores médios (MPa) da resistência de união, sob microtração, para os grupos testados, nos períodos avaliados: imediato e após termociclagem.

Grupos	Tempo			
	Imediato (IM)		Termociclagem (TC)	
	n	Média (DP) [†]	n	Média (DP) [†]
SB	6	38,10 (7,01) Aa	5	37,33 (11,79) Aa
CF	6	45,44 (4,77) Aa	3	43,20 (29,91) Aa
SB + CHX	6	39,13 (10,25) Aa	6	39,86 (7,59) Aa
CF + CHX antes	6	44,56 (10,65) Aa	5	32,82 (14,86) Aa
CF + CHX depois	6	40,92 (10,61) Aa	6	39,75 (12,42) Aa

[†]Letras maiúsculas iguais em uma mesma coluna e letras minúsculas iguais em uma mesma linha indicam semelhança estatística, (ANOVA fatorial e Tukey, p<0,05)

n = nº de dentes

DP = desvio padrão

Figuras

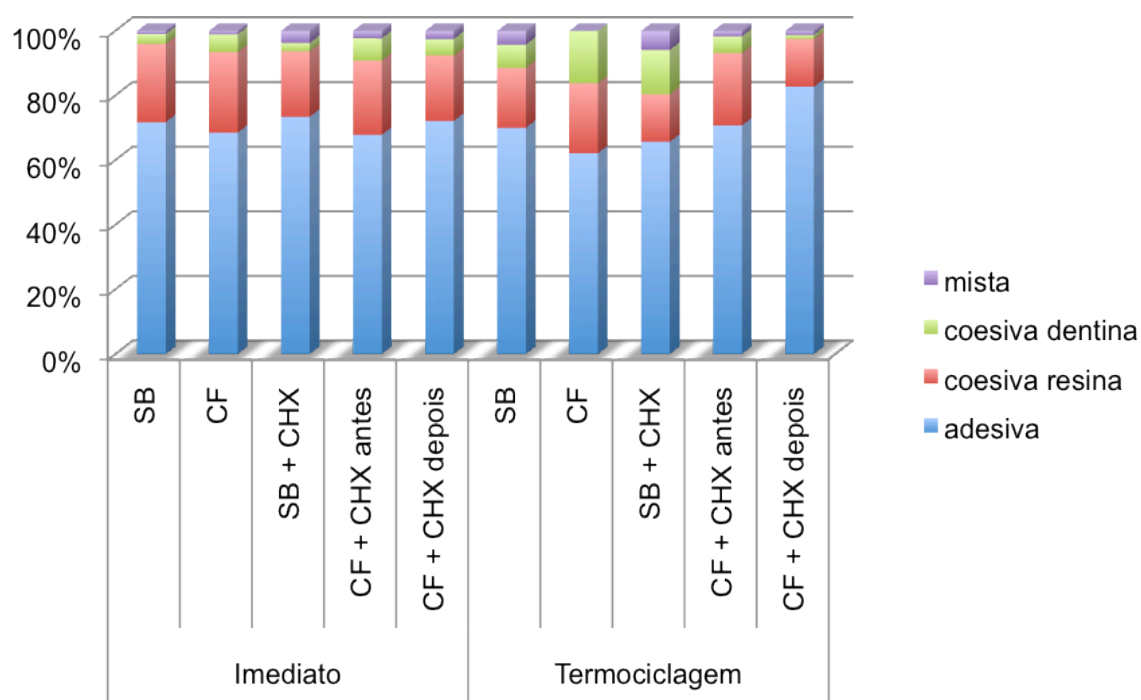


Figura 1. Gráfico de barras: percentual do padrão de fratura das interfaces de acordo com os grupos em estudo, submetidos ao teste de resistência de união em tempo imediato e após termociclagem.

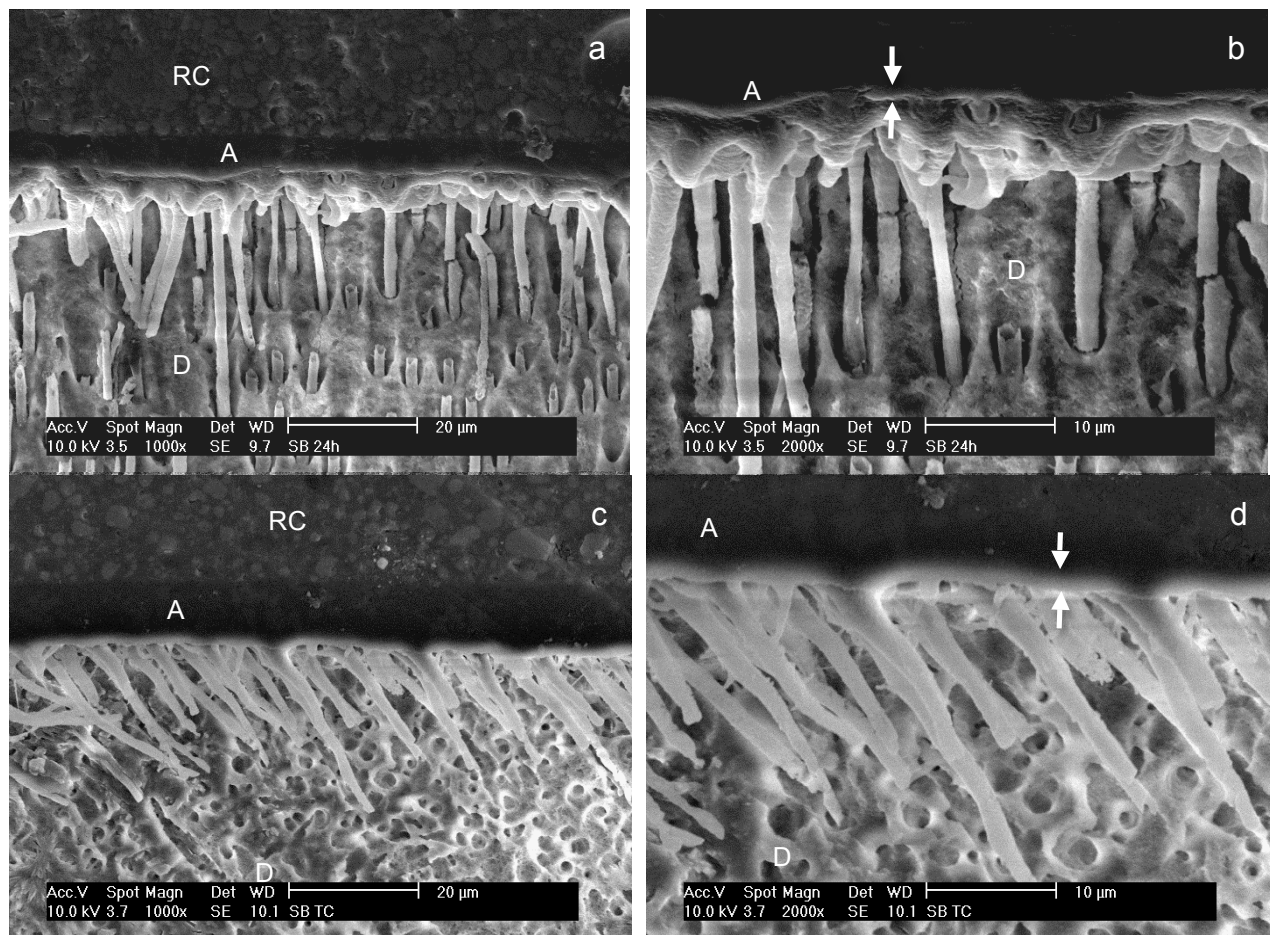


Figura 2. Fotomicrografias em MEV representativas da união resina-dentina em dentes decíduos com o sistema adesivo Adper Single Bond 2, (a e b) imediato e (c e d) após termociclagem, em aumentos de 1000X e 2000X, respectivamente. A: camada de adesivo; entre setas: camada híbrida; RC: resina composta e D: dentina.

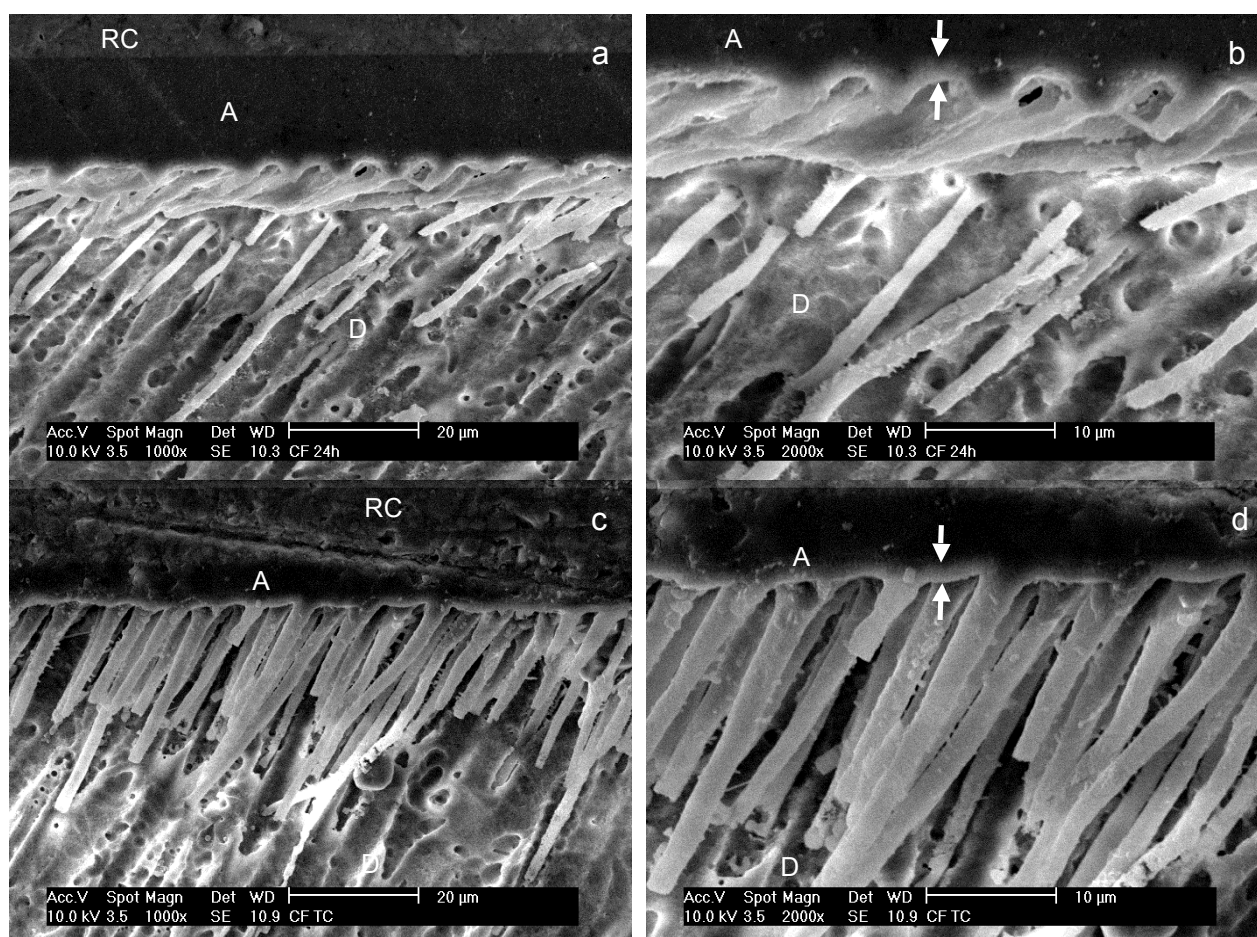


Figura 3. Fotomicrografias em MEV representativas da união resina-dentina em dentes decíduos com o sistema adesivo Clearfil SE Bond, (a e b) imediato e (c e d) após termociclagem, em aumentos de 1000X e 2000X, respectivamente. A: camada de adesivo; entre setas: camada híbrida; RC: resina composta e D: dentina.

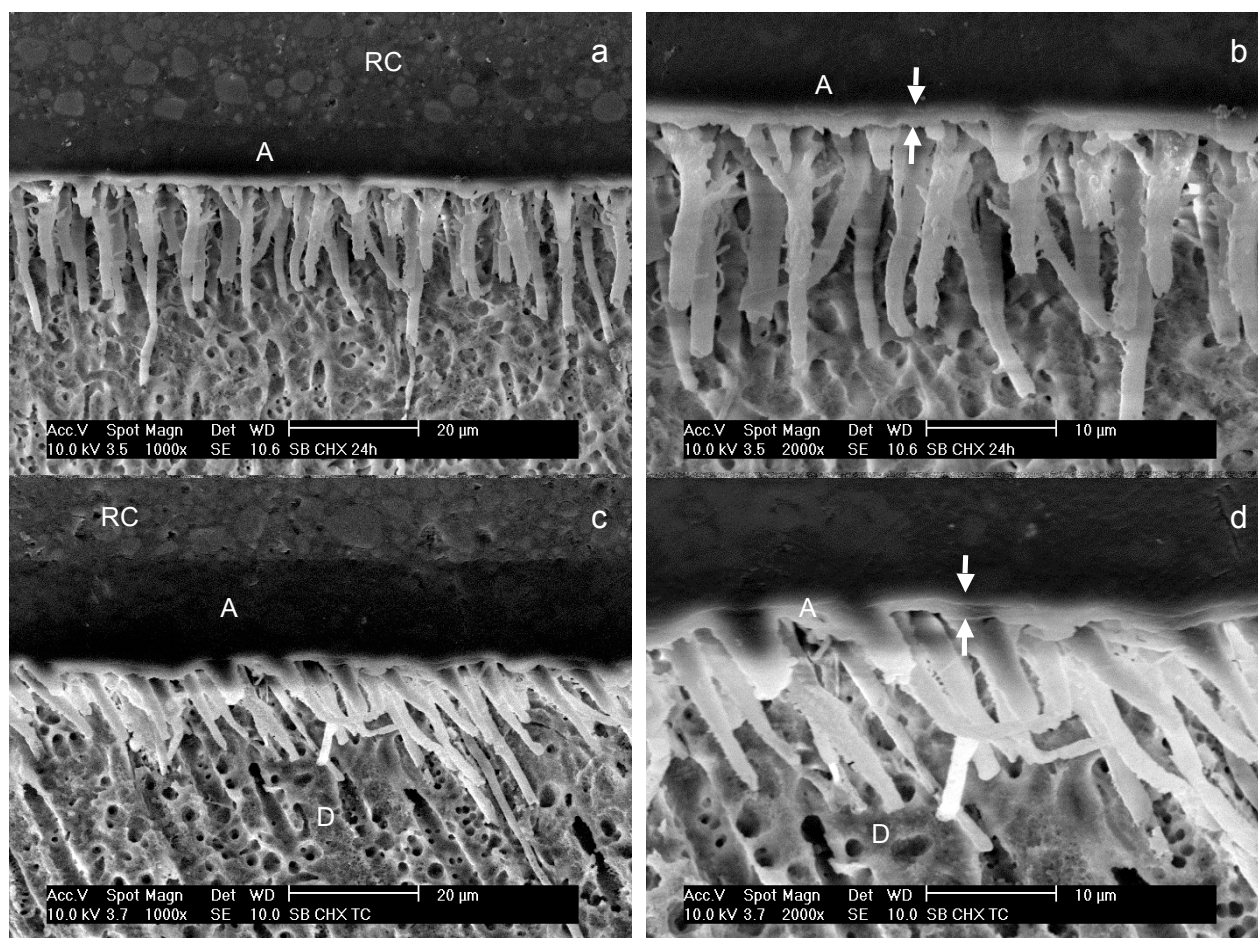


Figura 4. Fotomicrografias em MEV representativas da união resina-dentina em dentes decíduos com o sistema adesivo Adper Single Bond 2 com aplicação de CHX após condicionamento ácido, (a e b) imediato e (c e d) após termociclagem, em aumentos de 1000X e 2000X, respectivamente. A: camada de adesivo; entre setas: camada híbrida; RC: resina composta e D: dentina.

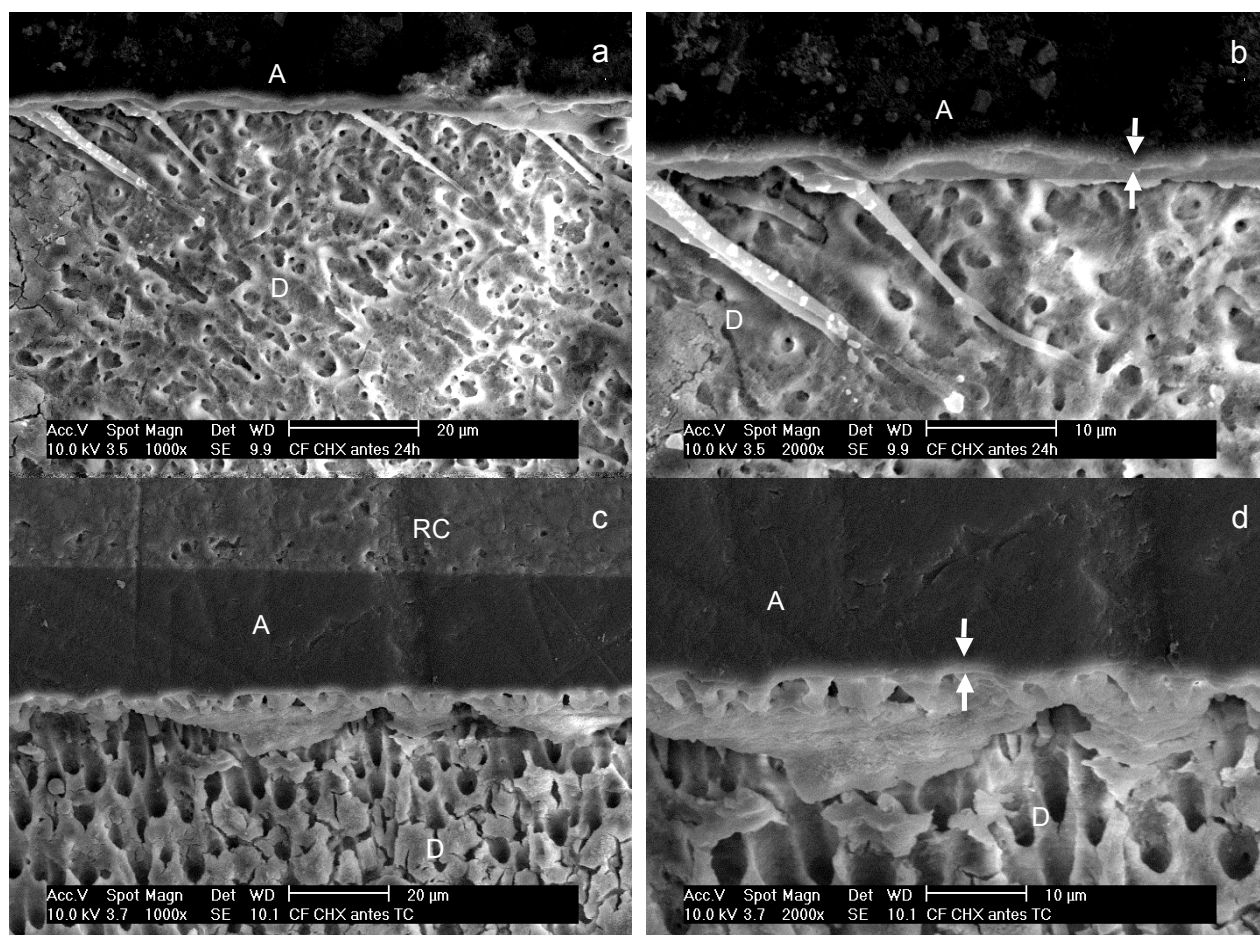


Figura 5. Fotomicrografias em MEV representativas da união resina-dentina em dentes decíduos com o sistema adesivo Clearfil SE Bond com aplicação de CHX antes do *primer* ácido, (a e b) imediato e (c e d) após termociclagem, em aumentos de 1000X e 2000X, respectivamente. A: camada de adesivo; entre setas: camada híbrida; RC: resina composta e D: dentina.

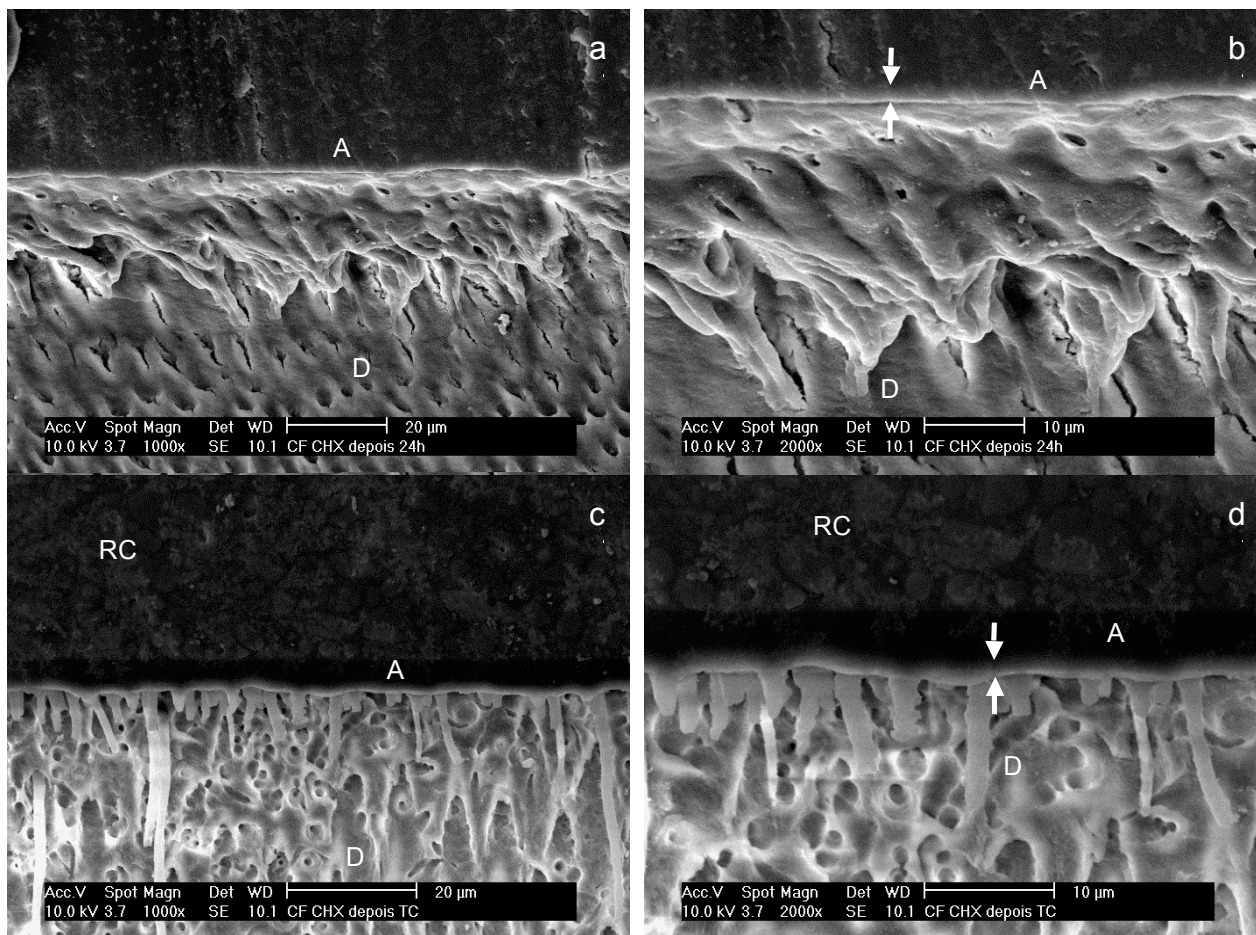


Figura 6. Fotomicrografias em MEV representativas da união resina-dentina em dentes decíduos com o sistema adesivo Clearfil SE Bond com aplicação de CHX depois do *primer* ácido, (a e b) imediato e (c e d) após termociclagem, em aumentos de 1000X e 2000X, respectivamente. A: camada de adesivo; entre setas: camada híbrida; RC: resina composta e D: dentina.

2.2 Versão em inglês

Influence of chlorhexidine on the bond strength of adhesive systems in primary dentin: *in vitro* study

Souza KF; Gondo R; Miranda C; Almeida ICS

Keywords: Chlorhexidine, primary tooth, dentin, dentin-bonding agents, paediatric dentistry.

Corresponding author: Karin Faust Souza
Av. Rodovalho, 649, ap. 301 – Vila Moema
Tubarão – SC – Brazil
CEP: 88705-090
Telephone: +55 (0) 48 3052-3993
e-mail: karinfaust@hotmail.com

Abstract

Aim: To evaluate the influence of the application of 2% chlorhexidine solution on the bond strength of 2 adhesive systems in primary dentin.

Design: Caries free primary molars were selected and prepared to obtain flat occlusal surfaces in dentin, and they were randomly divided into 5 groups (n=12): Adper Single Bond 2 (SB); Clearfil SE Bond (CF); Adper Single Bond 2 + chlorhexidine applied after acid etching (SB+CHX); Clearfil SE Bond + chlorhexidine applied before primer (CF+CHX before), and applied after primer (CF+CHX after). The adhesives and composite resin (Z350XT) were applied according to manufacturers, and 2% chlorhexidine was applied for 60s. Next, they were stored in distilled water (37°C/24h) and then subdivided (n=6) for analysis immediately (IM) and after thermocycling (TC). The specimens were sectioned and 0.8mm² resin-dentin sticks were tested under microtensile at 0.5mm/min (Instron). The values were submitted to factorial ANOVA and Tukey's test (p<0.05).

Results: The mean values obtained from the IM μ TBS test were [MPa(SD)]: CF-45.44(4.77); CF+CHX before-44.56(10.65); CF+CHX after-40.92(10.61); SB+CHX-39.13(10.25); SB-38.10(7.01) and TC were: CF-43.20(29.91); SB+CHX-39.86(7.59); CF+CHX after-39.75(12.42); SB-37.33(11.79); CF+CHX before-32.82(14.86).

Conclusion: 2% chlorhexidine had no statistically significant influence on the bond strength of adhesive systems in primary dentin either immediately or after thermocycling.

Introduction

The effect of chlorhexidine (CHX) on inhibition of dentin matrix metalloproteinases (MMPs) has been studied with total etching adhesive systems both in permanent¹⁻⁸ and primary teeth.^{3,5,6,9,10} There is evidence that its use following acid etching of the dentin and prior to adhesive application does not affect the immediate bond strength and can slow down the process of degradation of adhesive interfaces.

In relation to self-etching systems, it has been observed studies with permanent teeth in which the CHX was used prior to the application of the acidic primer of the 2-step self-etching system, and the results were compared with the action of CHX applied after the use of acid etching of conventional adhesive systems.^{11,12} However, if the goal of the use of CHX is to increase the longevity of restorations by the inhibition of the action of MMPs and consequent reduction of the degradation of collagen fibrils exposed due to incomplete infiltration of adhesive,^{13,14} it might be more indicated the application of CHX after the primer of the self-etching systems.¹⁵

In view of these considerations, this research was carried out in order to evaluate the influence of chlorhexidine on the bond strength of 2 different adhesive systems (CHX after total etching versus CHX applied before and after the self-etching primer) in primary dentin, since studies related to these materials are important, mainly to self-etching in primary teeth, because they represent an alternative to total etching adhesive systems, since it involves a simpler and more rapid procedure, characteristics that make these adhesives interesting for Paediatric Dentistry. This in vitro study was aimed at assessing the influence of 2% chlorhexidine solution on the bond strength of 2 adhesive systems (2-step total etching versus 2-step self-etching adhesives) immediately and after thermocycling in sound dentin of primary teeth and illustrate, by means of scanning electron microscopy (SEM), the formation of resin tags and hybrid layer.

Materials and methods

This study was approved by the Ethical Committee for Research on Human Beings of the Federal University of Santa Catarina (Protocol n° 931/10).

Selection and preparation of the teeth

Sixty human molars with sound occlusal surface were selected after cleaning with curettes, brushes Robinson and water, and analysis with a magnifying glass (10X).

The roots, when present, were abraded to approximately 2mm below the cementum-enamel junction by using a 220-grit silicon-carbide (SiC) paper (3M do Brasil, Sumará, SP, Brazil) with a polishing machine (Panambra-Struers DP-10, Panambra, São Paulo, Brazil) under water-cooling. Next, the remaining pulp tissue was removed and the pulp chamber was filled with Renamel blue composite resin (Cosmedent, Chicago, IL, USA) in order to distinguish the area of main adhesion and to reinforce the teeth during the cutting procedure.¹⁶ Etching was performed with 35% phosphoric acid (Ultra-Etch, Ultradent, South Jordan, UT, USA) and the Adper Scotchbond Multi-Purpose adhesive system (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) was applied according to the manufacturer's recommendation.

After filling the pulp chamber, the Filtek Z250 composite resin (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) was applied so that each tooth was approximately 3mm larger along its axis, thus reproducing the root partially and making further procedures easier.

Next, the tooth crowns were isolated with utility wax for insertion of the root portion into PVC tubes (25 x 20mm) isolated with petroleum jelly and containing acrylic resin.

Once the polymerisation was completed, the specimens were removed from the PVC tubes and the utility wax was removed with gauze from the occlusal surfaces.

The occlusal surface was abraded with a 220-grit SiC under water-cooling in order to expose the dentin. To confirm the absence of enamel, the specimens were dried with air jet and examined with stereoscopic magnifying glass (10X). Next, surface regularity and standardisation of the smear layer were performed by using 400 and 600-grit SiC mounted onto a polishing machine under cooling water in 4 different directions during 10s each, totalising 40s each.

Adhesive procedure

The groups are outlined in Table 1.

Application of 2% chlorhexidine digluconate solution (FGM, Joinville, SC, Brasil - lote: 120710) was performed by using disposable brush during 60s, with the specimens being dried with absorbing paper.

After application of the adhesive systems and their light-curing, the Filtek Z350 XT composite resin (3M ESPE, St. Paul, MN, USA), colour A2D, was applied at 3 increments of 1.5mm thickness, with each layer being light-cured for 40s as recommended by the manufacturer. Light-curing was performed with a LED light unit set (Ultra Lume, Ultradent, South Jordan, UT, USA) at an light intensity of $1095\text{W}/\text{cm}^2$, with radiometer-controlled (SDS-Kerr 910726, Kerr Corporation, CT, USA) every 5 teeth.

The specimens were stored in distilled water at 37°C in microbiological stove for 24h. Next, they were randomly subdivided into 2 groups ($n=6$): immediate analysis (IM) and post-thermocycling analysis (TC).

The thermal cycling was performed in accordance with the recommendations of the ISO 11405 standard (2003).¹⁷ The specimens were put into synthetic involucres (5530, Lupo, Araraquara, SP, Brazil) of different colours for identification of the groups. Were placed in the mobile recipient of a specific machine (Ética Equipamento Científicos S/A, São Paulo, SP, Brazil) for alternating baths at 5°C (± 2) and 55°C (± 2), totalising 500 cycles.¹⁸ The teeth remained 30s in each bath with a transferring time of 3s, yielding a cycle of 66s.

After either 24h storage or thermocycling, the specimens were individually attached to the acrylic support by means of a cyanoacrylate resin gel (Super Bonder, Henkel Loctite Adesivos Ltda., Itapevi, SP, Brazil). Next, they were positioned and longitudinally sectioned (perpendicularly to the adhesive interface) by using a cutting machine (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) with diamond disc of 0.3mm thickness (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) and operating at speed of 250rpm under water-cooling.

Mesio-distal sections were made so that slices of the specimens could be obtained. Next, sticky wax was applied to them and buccal-lingual sections were prepared for obtaining stick-shaped samples with transversal section of approximately 0.8mm^2 .

μTBS test

Initially, the cross-sectional area of each stick was measured individually with a digital calliper (Modelo 727, Starett, Itu, SP, Brazil).

The sticks were attached to Geraldelli devices with a cyanoacrylate resin gel. These devices were adapted to an universal testing machine (Model n° 4444, Instron Corp., Canton, MA, USA) at a crosshead speed of $0.05\text{mm}/\text{min}$ in order to fracture the samples.

The bond strength values were calculated in megapascals (MPa), were obtained dividing the applied force (registered in Newtons) by the cross-sectional area of each stick (mm^2) as follows:

$$\mu\text{TBS}(\text{MPa}) = \text{applied force (N)} / \text{area}(\text{mm}^2)$$

Evaluation of the failure mode after μTBS test

In order to assess the failure mode, each sample was evaluated with an optical microscope (LEICA DM 4000M, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Germany) at magnification of 50X, being classified as follows (adapted from Sardella et al., 2005):¹⁹

- Cohesive: a) when failure occurred in the composite resin;
b) when failure occurred in the dentin structure.
- Adhesive: when failure occurred at the adhesive-dentin interface.
- Mixed: when the failure involved both cohesive and adhesive types.

SEM analysis of the resin-dentin interface

A representative sample of the outer slices, obtained by first cutting direction during the preparation for the μTBS test was prepared for analysis of the resin-dentin interface in scanning electron microscopy (SEM), as described by Kaaden, Schmalz, and Powers (2003).²⁰

Statistical analysis

The failure modes were descriptively evaluated, considering for statistical analysis the values found in the samples exhibiting fractures classified as adhesive. The fractures visually occurring out of the adhesion area, either in dentin or in resin, were excluded because they did not represent a measurement of the bond strength.²¹

The measurements of the cross-sectional area of the samples included for analysis were calculated for each tooth and then submitted to factorial ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$).

As for the μTBS test, the average bond strength of each tooth was calculated for each experimental group, and data were compared using factorial ANOVA (treatment x adhesive x time) and Tukey's test ($p < 0.05$). The results regarding the microtensile test were calculated by considering the tooth as an experimental unit so that the dentin variables of each element did not interfere with the assessments.²²

Results

Bond strength test

The mean values regarding the cross-section area of the samples are listed in Table 2, as well as the results of the statistical analysis (factorial ANOVA and Tukey's test).

Table 3 shows the amount of early failures that occurred in each adhesive system used in the present study. The results regarding the descriptive analysis of the failure mode, which occurred in each experimental condition, are represented by graphic bars (Figure 1).

The mean values obtained from the μTBS test for each tooth are listed in Table 4, as well as the results of the statistical analysis (factorial ANOVA and Tukey's test).

Analysis of the resin-dentin interface

Figures 2-6 illustrate the adhesive interfaces observed by SEM.

Discussion

According to the methodology employed, the Adper Single Bond 2 and Clearfil SE Bond adhesive systems showed similar performance in terms of bond strength when applied to the dentin of sound primary teeth, regardless of treatment used (with or without CHX) and time elapsed in mechanical assay (immediate and after thermocycling).

The performance in relation to the immediate bond strength, studies has shown satisfactory and similar performances between the 2-step adhesive systems,^{16,23-25} corroborating the results found in the present work. Other studies have noted the superiority of immediate bond strength of Adper Single Bond 2¹⁹ and Clearfil SE Bond.²⁶ Divergence possibly related to variations in steps of the methodologies used.

In vivo studies demonstrated that the use of CHX as coadjuvant agent in the process of dentin adhesion reduces significantly the degradation speed of the adhesive interfaces in primary^{3,9} and permanent teeth.^{1,2} Effect possibly related to its ability to act as an inhibitor of MMPs, effect similar to those of natural inhibitors of such enzymes.²⁷

When CHX was used following acid etching and prior to application of Adper Single Bond 2, no statistically significant difference was observed in the immediate bond strength, which is in accordance with Ricci et al. (2010)⁶ and Manfro et al. (2010)⁵, who also used human primary teeth, and similar to studies using human permanent teeth^{4,7,8} or bovine teeth.¹¹ Important observation since, studies suggest that CHX can be used together with this adhesive system after acid etching in order to increase the restoration longevity in both primary^{3,6,9} and permanent teeth.^{1,2,4,6,8}

Regarding the assessment of the influence of CHX on the Clearfil SE Bond, there is doubt about the moment CHX should be used in the self-etching technique: before or after primer, so this latter condition was also evaluated. Osorio et al. (2011)¹⁵ observed decreased degradation of collagen by approximately 30% when CHX was used after application of the primer Clearfil SE Bond. In the present study, similar results were observed in the immediate bond strength values of between these both moments. No significant difference was observed when CHX was applied before primer, thus corroborating studies conducted by Sanabe (2009)²⁴ and Mobarak; El-Korashy; Pashley (2010),²⁶ who assessed the same moment of CHX application in human permanent teeth. However, Campos et al. (2009)²² observed a decrease in the immediate bond strength in bovine permanent teeth by evaluating the effect of CHX on Clearfil SE Bond adhesive before primer. The authors suggest that interactions between CHX and adhesive components may exist, perhaps decreasing its wettability and dentin conditioning level.

In the present study, the bond strength was not influenced by thermocycling. In addition, as flat dentin samples were used for study, the adhesive interface was protected by an adhesion margin in enamel, a factor which may have influenced the results. This situation, however, seems to represent more adequately the existing condition in the oral environment, as described by De Munck et al. (2003).²⁸

SEM analysis of the patterns of resin-dentin interface showed that it is possible to identify in groups SB, CF and SB + CHX, with and without thermocycling, the formation of long resin tags, some of this with lateral ramifications, with side branches, most of which presenting fractures resulting from the loss of dentinal support as the dentin was removed by treatment with chloridric acid and sodium hypochlorite during sample preparation. The statement that the thickness of hybrid layer and formation of long resin

tags do not indicate adhesion effectiveness,¹⁹ which is in accordance with the present study as SEM analysis showed that the visual differences do not correspond to the high values of bond strength found in all experimental groups, thus corroborating the findings by Senawongse et al. (2004)²³ and Miranda et al. (2006).²⁴

Application of CHX during the total etch technique did not seem to influence the formation of resin tags and hybrid layer as reported in the literature.^{6,10} Nevertheless, it was possible to observe a different pattern when CHX was applied to the self-etching adhesive system, both before and after primer, thus suggesting a negative interference on the infiltration of either primer or adhesive, respectively.

The use of CHX is interesting from a clinical standpoint, in order to increase the longevity of dental restorations, it is already part of the routine of some clinicians, used for cleaning cavity preparations,²⁹ but it could be seen with restriction by paediatric dentists to be another step in the restorative procedure. For self-etching systems, it has been suggested the incorporation of CHX to the acidic primer³⁰ and, in relation to the total etching technique, was indicated the use of acid containing CHX.^{4,8}

Given these considerations, it is emphasized that further research is needed to assess the influence of CHX on the longevity of restorations in primary teeth with both 2-step adhesive systems, the total etching and the self-etching.

Conclusion

- In sound primary teeth, the microtensile bond strength of the adhesive systems studied, Adper Single Bond 2 and Clearfil SE Bond, was found to be similar both immediately and after thermocycling, and were not influenced by the application of 2% chlorhexidine;

- The moment for CHX application (before or after primer) in the self-etching technique did not promote difference in the bond strength;

- Analysis of the resin-dentin interface showed a different pattern compared to other experimental groups when CHX was applied in the self-etching adhesive system, but no difference was found in the bond strength.

Bullet Points

- *What this paper adds*

This article contributes by clarifying the use of chlorhexidine as alternative agent for increasing the longevity of restorations in primary teeth.

- *Why this paper is important to paediatric dentists*

The results of the present study suggest that both 2-step adhesive systems, the total etch and the self-etching, showed the same effectiveness in primary dentin, and the use of chlorhexidine had no interference with the performance of the adhesive systems studied, thus being an alternative agent for increasing the longevity of restorations.

References

1. Brackett WW, Tay FR, Brackett MG, Dib A, Sword RJ, Pashley DH. The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo. *Oper Dent* 2007; 32: 107-111.
2. Carrilho MR, Geraldini S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjaderhane L et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res* 2007; 86: 529- 533.

3. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res* 2005; 84: 741-746.
4. Stanislawczuk R, Amaral RC, Grande CZ, Gagler D, Reis A, Loguercio AD. Chlorhexidine-containing acid conditioner preserves the longevity of resin–dentin bonds. *Oper Dent* 2009; 34: 483-492.
5. Manfro ARG, Reis A, Loguercio AD, Imparato JCP, Raggio DP. Effect of chlorhexidine on the bond strength to dentin in primary teeth. *Rev Odonto Ciênc* 2010; 25: 88-91.
6. Ricci HA, Sanabe ME, Costa CA, Hebling J. Effect of chlorhexidine on bond strength of two-step etch-and-rinse adhesive systems to dentin of primary and permanent teeth. *Am J Dent* 2010; 23: 128-132.
7. Sanabe ME, Costa CA, Hebling J. Exposed collagen in aged resin-dentin bonds produced on sound and caries-affected dentin in the presence of chlorhexidine. *J Adhes Dent* 2011; 13: 117-124.
8. Stanislawczuk R, Reis A, Loguercio AD. A 2-year in vitro evaluation of a chlorhexidine-containing acid on the durability of resin–dentin interfaces. *J Dent* 2011; 39: 40-47.
9. Ricci HA, Sanabe ME, de Souza Costa CA, Pashley DH; Hebling J. Chlorhexidine increases the longevity of *in vivo* resin–dentin bonds. *Eur J Oral Sci* 2010; 118: 411-416.
10. Azevedo TD, Bezerra AC, Faber J, de Toledo OA. Evaluation of chlorhexidine on the quality of the hybrid layer in noncarious primary teeth: an *in vitro* study. *J Dent Child* 2010; 77: 25-31.
11. Campos EA, Correr GM, Leonardi DP, Pizzatto E, Morais EC. Influence of chlorhexidine concentration on microtensile bond strength of contemporary adhesive systems. *Braz Oral Res* 2009; 23: 340-345.
12. Mobarak EH, El-Korashy DI, Pashley DH. Effect of chlorhexidine concentrations on micro-shear bond strength of self-etch adhesive to normal and caries-affected dentin. *Am J Dent* 2010; 23: 217-222.
13. Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res* 2003; 82: 141-145.
14. Wang Y, Spencer P. Physicochemical interactions at the interfaces between self-etch adhesive systems and dentine. *J Dent* 2004; 32: 567-579.
15. Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Ruiz-Requena ME, Pashley D, Tay F et al. Effect of dentin etching and chlorhexidine application on metalloproteinase-mediated collagen degradation. *Eur J Oral Sci* 2011; 119: 79-85.
16. Miranda C, Prates LHM, Chain MC, Vieira RS. Microtensile bond strength of 4 dentin adhesives to primary dentin. *J Dent Child* 2010; 77: 126-134.

17. International Organization for Standardization. ISO 11405: Dental materials - Testing of adhesion to tooth structure. 2 ed. Geneva, 2003.
18. Korkmaz Y, Gurgan S, Firat E, Nathanson D. Effect of adhesives and thermocycling on the shear bond strength of a nano-composite to coronal and root dentin. *Oper Dent* 2010; 35: 522-529.
19. Sardella TN, de Castro FL, Sanabe ME, Hebling J. Shortening of primary dentin etching time and its implication on bond strength. *J Dent* 2005; 33: 355-362.
20. Kaaden C, Schmalz G, Powers JM. Morphological characterization of the resin-dentin interface in primary teeth. *Clin Oral Invest* 2003; 7: 235-240.
21. De Andrade AM, Moura SK, Reis A, Loguercio AD, Garcia EJ, Grande RH. Evaluating resin-enamel bonds by microshear and microtensile bond strength tests: effects of composite resin. *J Appl Oral Sci* 2010; 18: 591-598.
22. Loguercio AD, Barroso LP, Grande RHM, Reis A. Comparison of intra- and intertooth resin-dentin bond strength variability. *J Adhes Dent* 2005; 7: 151-158.
23. Senawongse P, Harnirattisai C, Shimada Y, Tagami J. Effective bond strength of current adhesive systems on deciduous and permanent dentin. *Oper Dent* 2004; 29: 196-202.
24. Miranda C, Prates LHM, Vieira RS, Calvo MCM. Shear bond strength of different adhesives systems to primary dentin and enamel. *J Clin Pediat Dent* 2006; 31: 35-40.
25. Sanabe ME, Kantovitz KR, Costa CA, Hebling J. Effect of acid etching time on the degradation of resin-dentin bonds in primary teeth. *Am J Dent* 2009; 22: 37-42.
26. Nakornchai S, Harnirattisai C, Surarit R, Thiradilok S. Microtensile bond strength of a total-etching versus self-etching adhesive to caries-affected and intact dentin in primary teeth. *JADA* 2005; 136: 477-483.
27. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004; 83: 216-221.
28. De Munk J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res* 2003; 82: 136-140.
29. Ersin NK, Candan U, Aykut A, Eronat C, Belli S. No adverse effect to bonding following caries disinfection with chlorhexidine, *J Dent Child* 2009; 76: 20-27.
30. Zhou J, Tan J, Yang X, Cheng C, Wang X, Chen L. Effect of chlorhexidine application in a self-etching adhesive on the immediate resin-dentin bond strength. *J Adhes Dent* 2010; 12: 27-31.

Tables

Table 1. Adhesive systems studied: composition, pH, groups, application mode, and batch number.

Adhesive system	Composition [†]	pH	Groups	Application Mode [§]	Batch number
Adper Single Bond 2	Water, ethanol, HEMA, Bis-GMA, dimethacrylates, photo-initiator systems, functional methacrylate of co-polymers of polyacrylate, polyitaconic, and polyalkenoic acids	0.6* (acid)	SB	a; b; c; d; e; f	BPBR
			SB + CHX	a; b; c; g; c; d; e; f	
Clearfil SE Bond	<i>Primer:</i> 10-MDP, HEMA, hydrophilic methacrylate, di-canforquinone, N-N-diethanol P-toluidine, water. <i>Adhesive:</i> MDP, HEMA, Bis-GMA, hydrophilic methacrylate, di-canforquinone, N-N-diethanol P-toluidine, silanised colloidal silica	2.0* (primer)	CF	h; i; e; f	<i>primer:</i> 00954A <i>adhesive:</i> 01415A
			CF + CHX before	g; c; h; i; e; f	
			CF + CHX after	h; g; c; i; e; f	

*Manufacturer's information

[†]*Abbreviation:* HEMA: 2-Hydroxyethyl methacrylate; Bis-GMA: bisphenol-glycidyl-methacrylate; 10-MDP: 10--methacryloyloxydecyl di-hydrogen phosphate[§]*Application mode:* a) etching - 35% phosphoric acid (15s); b) rinsing (10s); c) removing wetness with absorbing paper without over drying the dentin; d) application of 2 coats of adhesive; e) air drying the adhesive (2-5s); f) light cure (10s); g) application of 2% chlorhexidine digluconate (60s); h) application of primer (20s), and air dry ; i) application of adhesive.

Table 2. Mean values of the transversal section area of the stick-shaped samples analysed.

Groups	Time			
	Immediate (IM)		Thermocycling (TC)	
	n	Mean (SD) [†]	n	Mean (SD) [†]
SB	6	0.84 (0.09) Aa	5	0.82 (0.06) Aa
CF	6	0.76 (0.07) Aa	3	0.83 (0.05) Aa
SB + CHX	6	0.77 (0.05) Aa	6	0.85 (0.03) Aa
CF + CHX before	6	0.79 (0.04) Aa	5	0.83 (0.04) Aa
CF + CHX after	6	0.82 (0.08) Aa	6	0.82 (0.06) Aa

[†]Equal capital letters on the same column and equal small letters on the same line indicate statistical similarity (factorial ANOVA and Tukey's test, p<0.05)

n = number of teeth

SD = standard deviation

Table 3. Amount of premature failures (%) occurring in each adhesive system per sample.

Groups	Time			
	Immediate (IM)		Thermocycling (TC)	
	Total n	Premature failure n (%)	Total n	Premature failure n (%)
SB	99	0 (0)	72	2 (2.78)
CF	92	0 (0)	37	0 (0)
SB + CHX	80	1 (1.25)	106	4 (3.77)
CF + CHX before	87	0 (0)	63	5 (7.94)
CF + CHX after	79	0 (0)	81	0 (0)

n: number of sticks

Table 4. Mean values (MPa) of bond strength obtained from μ TBS test for the experimental groups at 2 moments: immediate and post-thermocycling periods.

Groups	Time			
	Immediate (IM)		Thermocycling (TC)	
	n	Mean (SD) [†]	n	Mean (SD) [†]
SB	6	38.10 (7.01) Aa	5	37.33 (11.79) Aa
CF	6	45.44 (4.77) Aa	3	43.20 (29.91) Aa
SB + CHX	6	39.13 (10.25) Aa	6	39.86 (7.59) Aa
CF + CHX before	6	44.56 (10.65) Aa	5	32.82 (14.86) Aa
CF + CHX after	6	40.92 (10.61) Aa	6	39.75 (12.42) Aa

[†]Equal capital letters on the same column and equal small letters on the same line indicate statistical similarity (factorial ANOVA and Tukey's test, $p < 0.05$)

n = number of teeth

SD = standard deviation

Figures

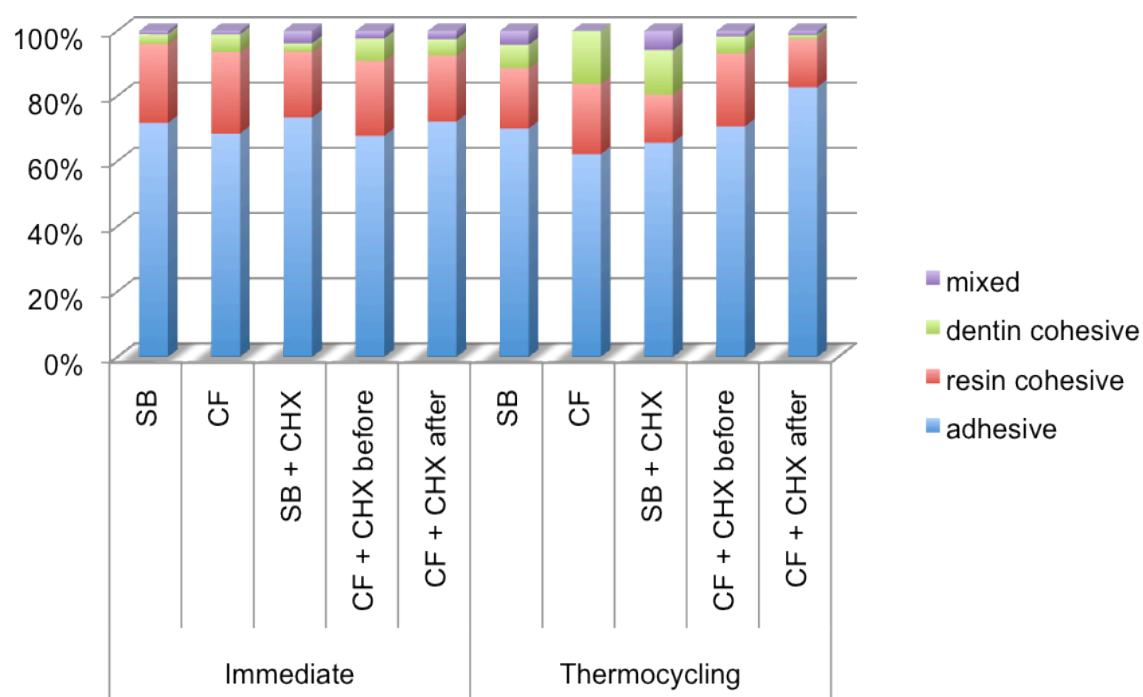


Figure 1. Bar graph: percentage of failure mode according to the experimental groups submitted to the μ TBS test immediately and after thermocycling.

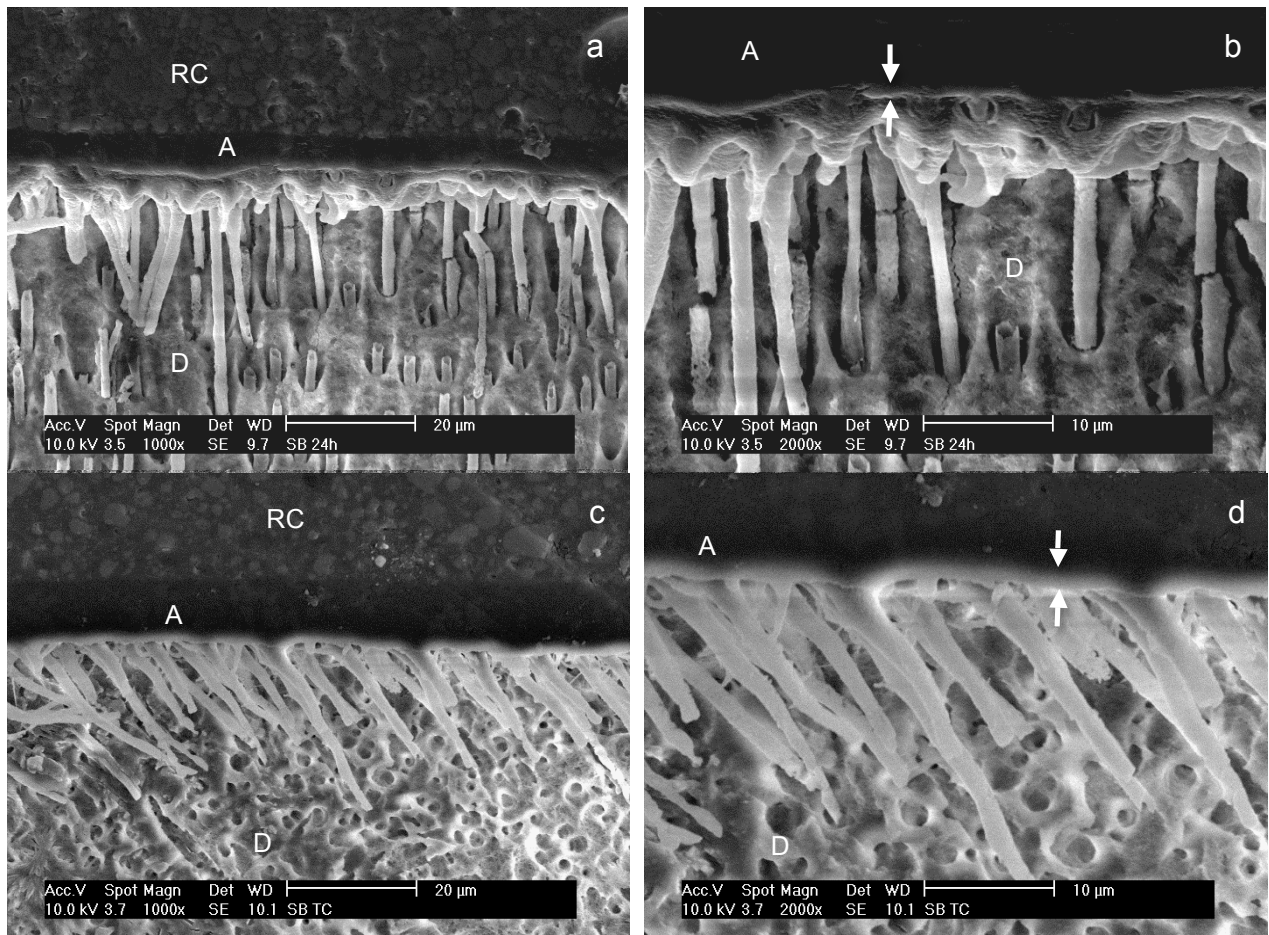


Figure 2. Representative SEM photomicrographs of the resin-dentin interface in primary teeth with Adper Single Bond 2, (a and b) immediately and (c and d) after thermocycling, at magnifications of 1000X and 2000X, respectively. A: adhesive layer; between arrows: hybrid layer; RC: composite resin, and D: dentin.

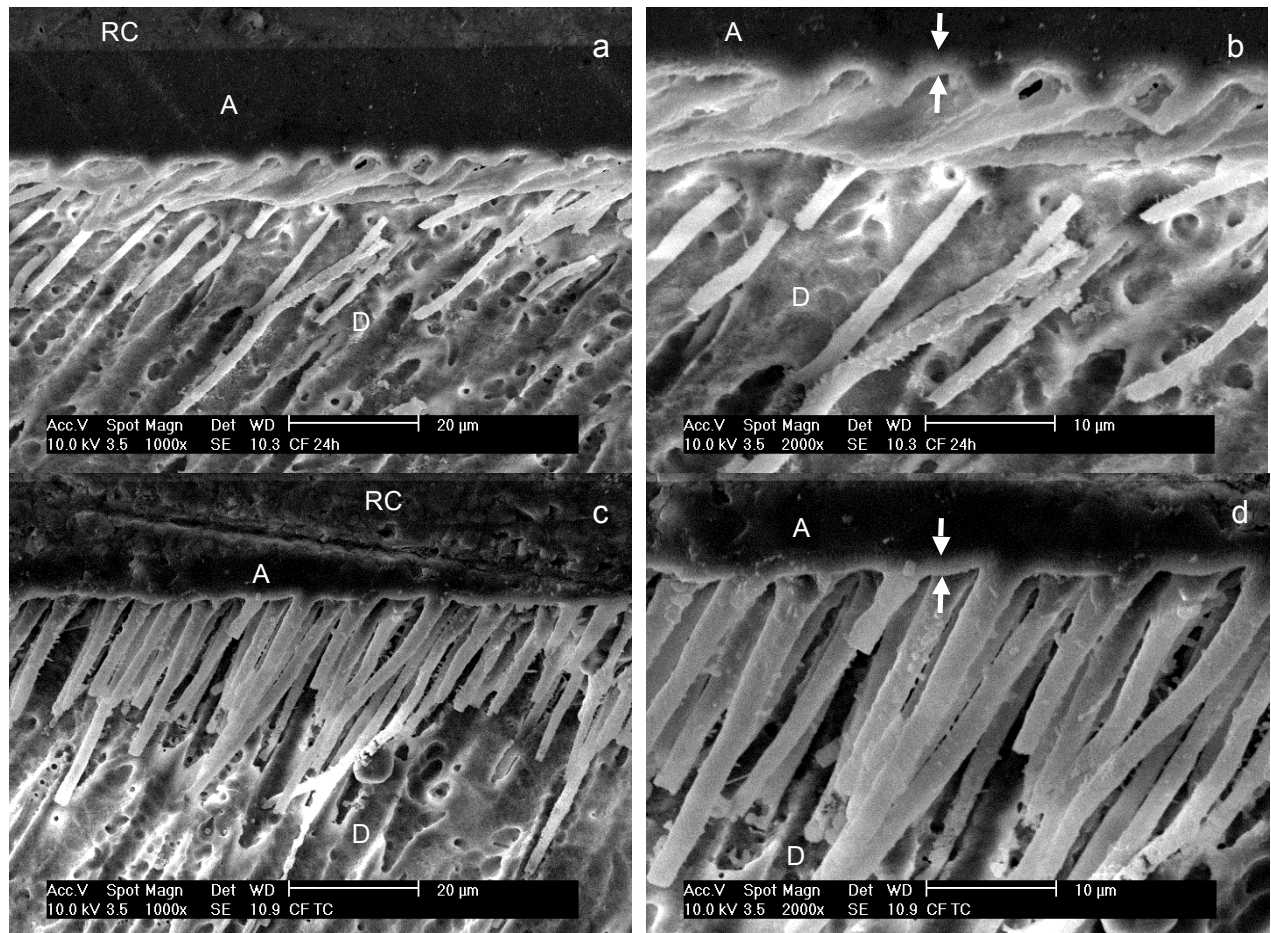


Figure 3. Representative SEM photomicrographs of the resin-dentin interface in primary teeth with Clearfil SE Bond, (a and b) immediately and (c and d) after thermocycling, at magnifications of 1000X and 2000X, respectively. A: adhesive layer; between arrows: hybrid layer; RC: composite resin, and D: dentin.

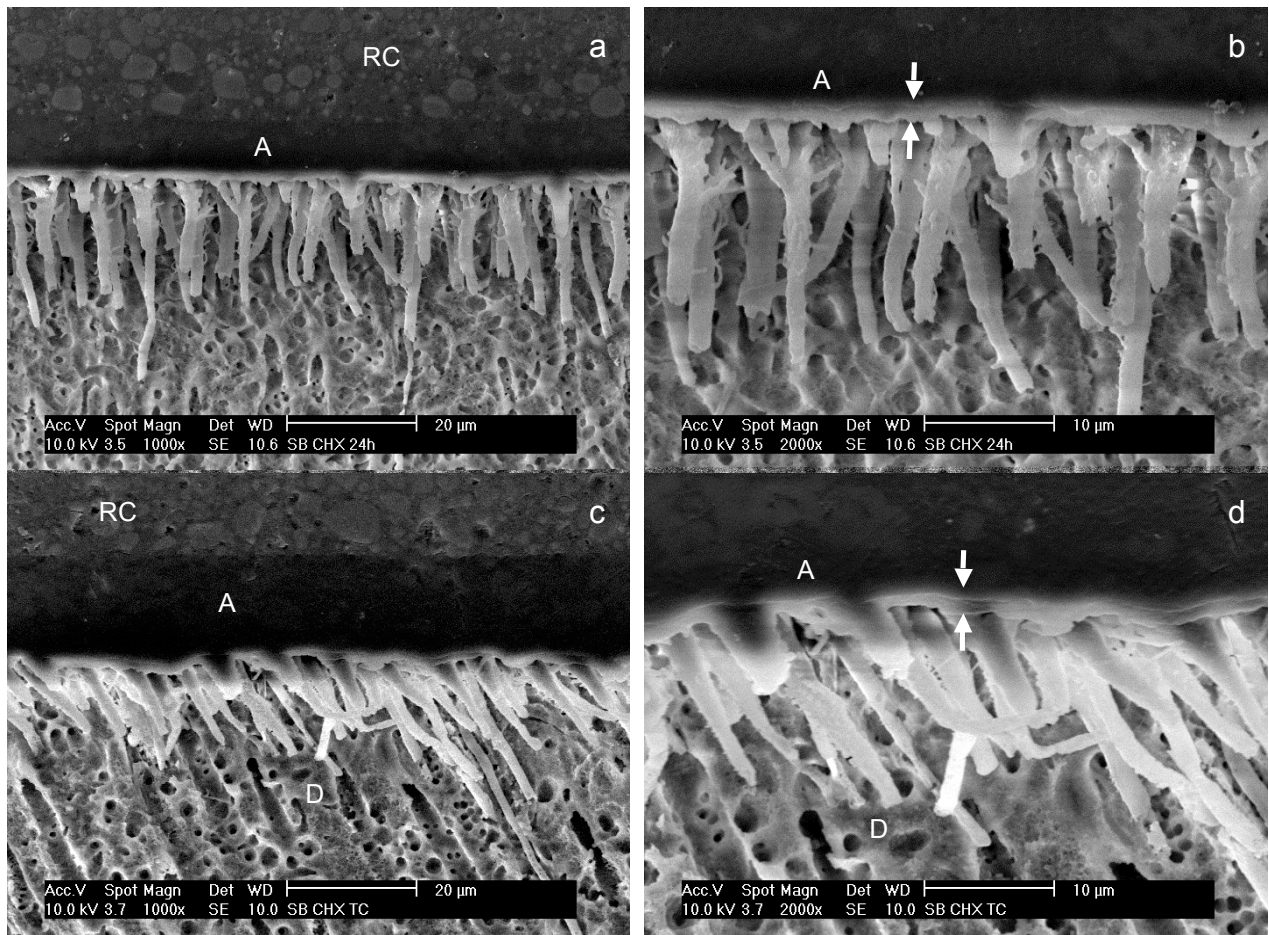


Figure 4. Representative SEM photomicrographs of the resin-dentin interface in primary teeth with Adper Single Bond 2 and CHX applied after acid etching, (a and b) immediately and (c and d) after thermocycling, at magnifications of 1000X and 2000X, respectively. A: adhesive layer; between arrows: hybrid layer; RC: composite resin, and D: dentin.

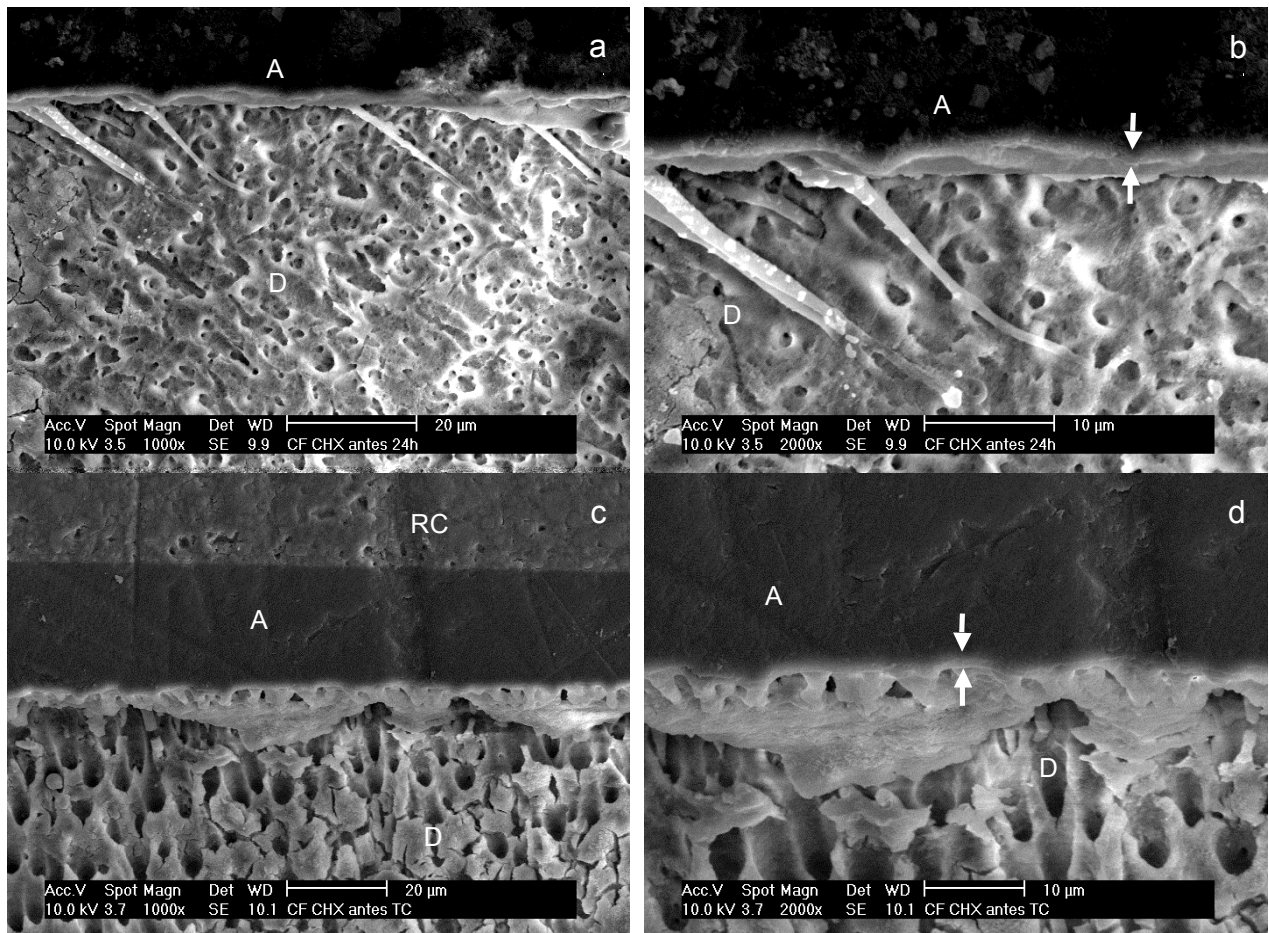


Figure 5. Representative SEM photomicrographs of the resin-dentin interface in primary teeth with Clearfil SE Bond and CHX applied before primer, (a and b) immediately and (c and d) after thermocycling, at magnifications of 1000X and 2000X, respectively. A: adhesive layer; between arrows: hybrid layer; RC: composite resin, and D: dentin.

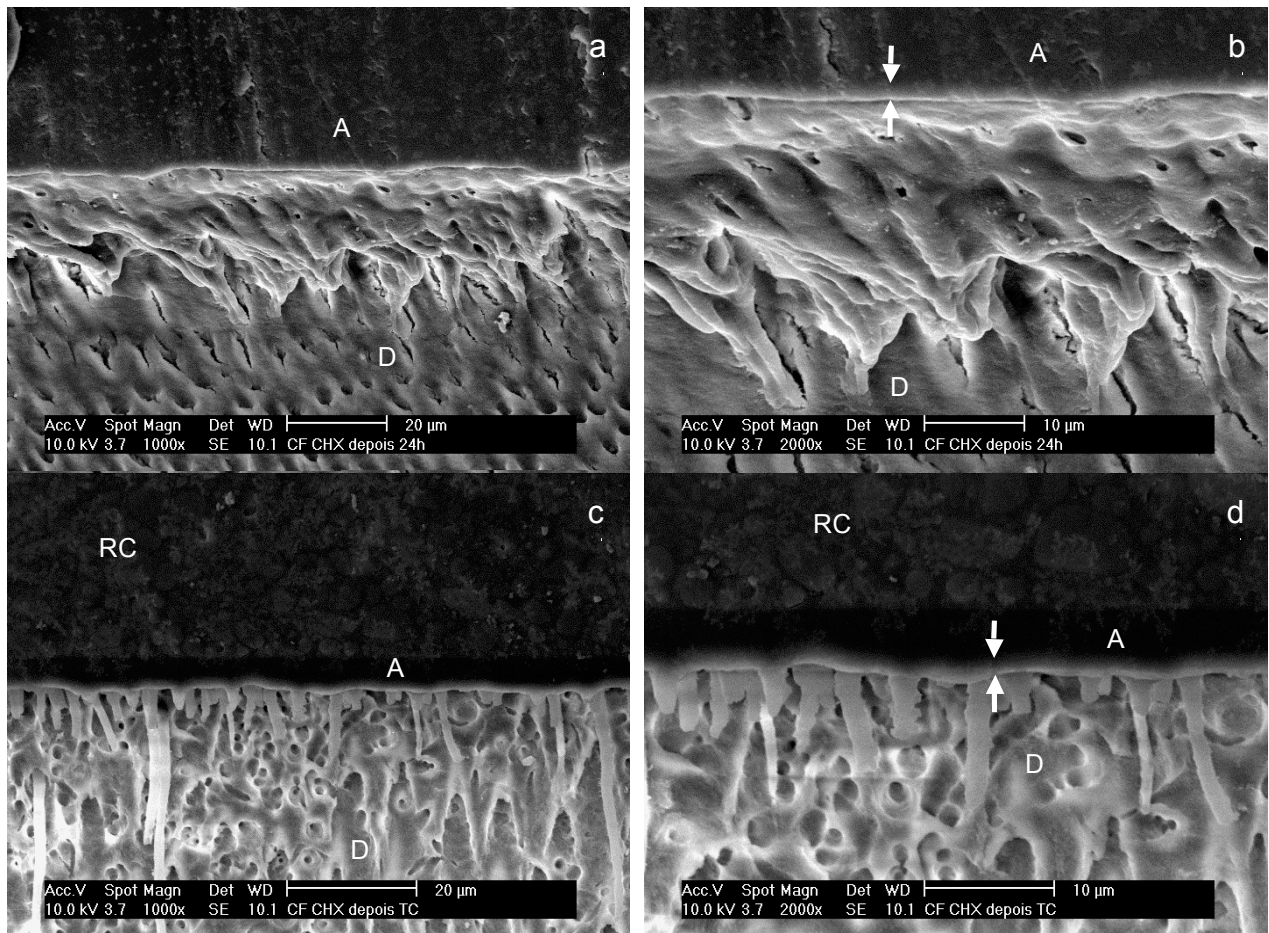


Figure 6. Representative SEM photomicrographs of the resin-dentin interface in primary teeth with Clearfil SE Bond and CHX applied after primer, (a and b) immediately and (c and d) after thermocycling, at magnifications of 1000X and 2000X, respectively. A: adhesive layer; between arrows: hybrid layer; RC: composite resin, and D: dentin.

REFERÊNCIAS¹

AGOSTINI, F.G.; KAADEN, C.; POWERS, J.M. Bond strength of self-etching primers to enamel and dentin of primary teeth. **Pediatric Dentistry**, v. 23, n. 6, p. 481-486, 2001.

AZEVEDO, T.D.P.L. et al. Evaluation of chlorhexidine on the quality of the hybrid layer in noncarious primary teeth: an *in vitro* study. **Journal of Dentistry for Children**, v. 77, n. 1, p. 25-31, 2010.

BRACKETT, W.W. et al. The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers *in vivo*. **Operative Dentistry**, v. 32, n. 2, p. 107-111, 2007.

BRACKETT, M.G. et al. *In vivo* chlorhexidine stabilization of hybrid layers of an acetone-based dentin adhesive. **Operative Dentistry**, v. 34, n. 4, p. 379-383, 2009.

BRACKETT, M.G. et al. The critical barrier to progress in dentine bonding with the etch-and-rinse technique. **Journal of Dentistry**, v. 39, n. 3, p. 238-248, 2011.

BRÄNNSTRÖM, M.; LINDEN, L.; JOHNSON, G. Movement of dentinal and pulpal fluid caused by clinical procedures. **Journal of Dental Research**, v. 47, n.5, p. 679-682, 1968.

BRESCHI, L. et al. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. **Dental Materials**, v. 24, n.1, p. 90-101, 2008.

BRESCHI, L. et al. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month *in vitro* study. **The Journal of Adhesive Dentistry**, v. 11, n. 3, p. 191-198, 2009.

BRESCHI, L. et al. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2 year *in vitro* study. **Dental Materials**, v. 26, n. 4, p. 320-325, 2010.

BURROW, M.F.; NOPNAKEEPPONG, U.; PHRUKKANON, S. A comparison of microtensile bond strengths of several dentin bonding systems to primary and permanent dentin. **Dental Materials**, v. 18, n. 3, p. 239-245, 2002.

CAMPOS, E.A. et al. Chlorhexidine diminishes the loss of bond strength over time under simulated pulpal pressure and thermo-mechanical stressing. **Journal of Dentistry**, v. 37, n. 2, p. 108-114, 2009a.

CAMPOS, E.A. et al. Influence of chlorhexidine concentration on microtensile bond strength of contemporary adhesive systems. **Brazilian Oral Research**, v. 23, n. 3, p. 340-345, 2009b.

CARRILHO, M.R.O. et al. Chlorhexidine preserves dentin bond *in vitro*. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 1, p. 90-94, 2007a.

CARRILHO, M.R.O. et al. *In vivo* preservation on hybrid layer by chlorhexidine. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 6, p. 529-533, 2007b.

CASAGRANDE, L. et al. Bond strength and interfacial morphology of two adhesive systems to deciduous dentin: *in vitro* study. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 29, n. 4, p. 317-322, 2005.

CASAGRANDE, L. et al. Bond strength and failure patterns of adhesive restorations in primary teeth aged in the oral environment. **American Journal of Dentistry**, v. 19, n. 5, p. 279-282, 2006.

CASAGRANDE, L. et al. *In vivo* outcomes of indirect pulp treatment using a self-etching primer versus calcium hydroxide over the demineralized dentin in primary molars. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 33, n. 2, p. 45-50, 2008.

CASAGRANDE, L. et al. Indirect pulp treatment in primary teeth: 4-year results. **American Journal of Dentistry**, v. 23, n. 1, p. 34-38, 2010.

CASTRO, F.L.A. Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite resin. **The Journal of Adhesive Dentistry**, v. 5, n. 2, p. 129-138, 2003.

CHANG, Y.E.; SHIN, D.H. Effect of chlorhexidine application methods on microtensile bond strength to dentin in Class I cavities. **Operative Dentistry**, v. 35, n. 6, p. 618-623, 2010.

CHAUSSAIN-MILLER, C. et al. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. **Journal of Dental Research**, v. 85, n. 1, p. 22-32, 2006.

DALLI, M. et al. Effect of 1% chlorhexidine gel on the bonding strength to dentin. **Journal of Dental Sciences**, v. 5, n. 1, p. 8-13, 2010.

DE ANDRADE, A.M. et al. Evaluating resin-enamel bonds by microshear and microtensile bond strength tests: effects of composite resin. **Journal of Applied Oral Science**, v. 18, n. 6, p. 591-598, 2010.

DE MUNCK, J. et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. **Journal of Dental Research**, v. 82, n. 2, p. 136-140, 2003.

DE MUNCK, J. et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. **Journal of Dental Research**, v. 84, n. 2, p. 118-132, 2005.

DE MUNCK, J. et al. Inhibition of enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 12, p. 1101-1106, 2009.

DE MUNCK, J. et al. Enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces produced by mild self-etch adhesives. **European Journal of Oral Sciences**, v. 118, n. 5, p. 494-501, 2010.

ECKERT, G.J; PLATT, J.A. A statistical evaluation of microtensile bond strength methodology for dental adhesives. **Dental Materials**, v. 23, n. 3, p. 385-391, 2007.

EL KALLA, I.H.; GARCIA-GODOY, F. Bond strength and interfacial micromorphology of four adhesive systems in primary and permanent molars. **ASDC Journal of Dentistry for Children**, v. 65, n. 3, p. 169-176, 1998.

ERSIN, N.K. et al. No adverse effect to bonding following caries disinfection with chlorhexidine. **Journal of Dentistry for Children**, v. 76, n. 1, p. 20-27, 2009.

FERRACANE, J.L. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. **Dental Materials**, v. 22, n. 3, p. 211-222, 2006.

GENDRON, R. et al. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 3, p. 437-439, 1999.

HAYAKAWA, T.; KIKUTAKE, K.; NEMOTO, K. Influence of self-etching primer treatment on the adhesion of resin composite to polished dentin and enamel. **Dental Materials**, v. 14, n. 2, p. 99-105, 1998.

HEBLING, J. et al. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. **Journal of Dental Research**, v. 84, n. 8, p. 741-746, 2005.

HOSOYA, Y. et al. Micro-tensile bond strength of sound and caries-affected primary tooth dentin measured with original designed jig. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials**, v. 77, n. 2, p. 241-248, 2006.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11405: Dental materials - Testing of adhesion to tooth structure. 2 ed. Geneva, 2003.

KAADEN, C.; SCHMALZ, G.; POWERS, J.M. Morphological characterization of the resin-dentin interface in primary teeth. **Clinical Oral Investigation**, v. 7, n. 4, p. 235-240, 2003.

KOMORI, P.C.P. et al. Effect of 2% chlorhexidine digluconate on the bond strength to normal versus caries-affected dentin. **Operative Dentistry**, v. 34, n. 2, p. 157-165, 2009.

KORKMAZ, Y. et al. Effect of adhesives and thermocycling on the shear bond strength of a nano-composite to coronal and root dentin. **Operative Dentistry**, v. 35, n. 5, p. 522-529, 2010.

KOSE, C. et al. A clorexidina como alternativa para maximizar a longevidade de união de restaurações adesivas. **International Journal of Brazilian Dentistry**, v. 6, n. 2, p. 153-159, 2010.

LOGUERCIO, A.D. et al. Comparison of intra- and intertooth resin-dentin bond strength variability. **Journal of Adhesive Dentistry**, v. 7, n. 2, p. 151-158, 2005.

LOGUERCIO, A.D. et al. Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin-dentin bond strength durability. **European Journal of Oral Sciences**, v. 117, n. 5, p. 587-596, 2009.

MANFRO, A.R.G. et al. Effect of chlorhexidine on the bond strength to dentin in primary teeth. **Revista Odonto Ciência**, v. 25, n. 1, p. 88-91, 2010.

MARQUEZAN, M. et al. Microtensile bond strength of contemporary adhesives to primary enamel and dentin. **The Journal of Pediatric Dentistry**, v. 32, n. 2, p. 127-132, 2008.

MAZZONI, A. et al. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives, **Biomaterials**, v. 27, n. 25, p. 4470-4476, 2006.

MIRANDA, C. et al. Shear bond strength of different adhesives systems to primary dentin and enamel. **The Journal of Pediatric Dentistry**, v. 31, n. 1, p. 35-40, 2006.

MIRANDA, C. et al. Microtensile bond strength of 4 dentin adhesives to primary dentin. **Journal of Dentistry for Children**, v. 77, n. 3, p. 126-134, 2010.

MOBARAK, E.H; EL-KORASHY, D.I.; PASHLEY, D.H. Effect of chlorhexidine concentrations on micro-shear bond strength of self-etch adhesive to normal and caries-affected dentin. **American Journal of Dentistry**, v. 23, n. 4, p. 217-222, 2010.

MOON, P.C.; WEAVER, J.; BROOKS, C.N. Review of matrix metalloproteinases' effect on the hybrid dentin bond layer stability and chlorhexidine clinical use to prevent bond failure. **The Open Dentistry Journal**, v. 20, n. 4, p. 147-152, 2010.

NAKABAYASHI, N.; KOJIMA, N.; MASUHARA, E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 16, n. 3, p. 1240-1243, 1982.

NAKABAYASHI, N.; SAIMI, Y. Bonding to intact dentin. **Journal of Dental Research**, v. 75, n. 9, p. 1706-15, 1996.

NAKORNCHAI, S. et al. Microtensile bond strength of a total-etching versus self-etching adhesive to caries-affected and intact dentin in primary teeth. **The Journal of the American Dental Association**, v. 136, n. 4, p. 477-483, 2005.

OSORIO, R. et al. Primary dentin etching time, bond strength and ultra-structure characterization of dentin surfaces. **Journal of Dentistry**, v. 38, n. 3, p. 222-231, 2010.

OSORIO, R. et al. Effect of dentin etching and chlorhexidine application on metalloproteinase-mediated collagen degradation. **European Journal of Oral Sciences**, v. 119, n. 1, p. 79-85, 2011.

PASHLEY, D.H. et al. Permeability of dentin to adhesive agents. **Quintessence International**, v. 24, n. 9, p. 618-631, 1993.

PASHLEY, D.H.; CARVALHO, R.M. Dentine permeability and dentine adhesion, **Journal of Dentistry**, v. 25, n. 5, p. 355-372, 1997.

PASHLEY D.H. et al. The microtensile bond test: a review. **Journal of Adhesive Dentistry**, v.1, n. 4, p. 299-309, 1999.

PASHLEY, D.H. et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. **Journal of Dental Research**, v. 83, n. 3, p. 216-221, 2004.

PERDIGÃO, J. Dentin bonding - variables related to the clinical situation and the substrate treatment. **Dental Materials**, v. 26, n. 2, p. e24-e37, 2010.

PEUMANS M. et al. Clinical effectiveness of contemporary adhesives: a systematic review of current clinical trials. **Dental Materials**, v. 21, n. 9, p. 864-881, 2005.

RICCI, H.A. et al. Bond strength of two-step etch-and-rinse adhesive systems to the dentin of primary and permanent teeth. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 35, n. 2, p. 163-168, 2010a.

RICCI, H.A. et al. Chlorhexidine increases the longevity of *in vivo* resin–dentin bonds. **European Journal of Oral Sciences**, v. 118, n. 4, p. 411-416, 2010b.

RICCI, H.A. et al. Effect of chlorhexidine on bond strength of two-step etch-and-rinse adhesive systems to dentin of primary and permanent teeth. **American Journal of Dentistry**, v. 23, n. 3, p. 128-132, 2010c.

SANABE, M.E. **Efeito da inibição de metaloproteinases da matriz dentinária na produção e estabilidade mecânica da união resina-dentina afetada por cárie.** 2009. 120f. Tese (Doutorado em Ciências Odontológicas - Área de Concentração Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

SANABE, M.E. et al. Effect of acid etching time on the degradation of resin-dentin bonds in primary teeth. **American Journal of Dentistry**, v. 22, n. 1, p. 37-42, 2009.

SANABE, M.E.; COSTA, C.A.; HEBLING, J. Exposed collagen in aged resin-dentin bonds produced on sound and caries-affected dentin in the presence of chlorhexidine. **Journal of Adhesive Dentistry**, v. 13, n. 2, p. 117-124, 2011.

SANO, H. et al. Nanoleakage: leakage within the hybrid layer. **Operative Dentistry**, v.20, p.18-25, 1995a.

SANO, H. et al. Comparative SEM and TEM observations of nanoleakage with-in the hybrid layer. **Operative Dentistry**, v. 20, n. 4, p. 160-167, 1995b.

SANO, H. Microtensile testing, nanoleakage, and biodegradation of resin-dentin bonds. **Journal of Dental Research**, v.85, n.1, p.11-14, 2006.

SANTERRE, J.P.; SHAJII, L.; LEUNG, B.W. Relation of dental composite formulations to their degradation and release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 12, n. 2, p. 136-151, 2001.

SARDELLA, T. N. et al. Shortening of primary dentin etching time and its implication on bond strength. **Journal of Dentistry**, v. 33, n. 5, p. 355-362, 2005.

SENAWONGSE, P. et al. Effective bond strength of current adhesive systems on deciduous and permanent dentin. **Operative Dentistry**, v. 29, n. 2, p. 196-202, 2004.

SOARES, F.Z.M. et al. Microtensile bond strength of different adhesive systems to primary and permanent dentin. **Pediatric Dentistry**, v. 27, n. 6, p. 457-462, 2005.

SOARES, C.J. et al. Effect of chlorhexidine application on microtensile bond strength to dentin. **Operative Dentistry**, v. 33, n. 2, p. 183-188, 2008.

STANISLAWCZUK, R. et al. Chlorhexidine-containing acid conditioner preserves the longevity of resin-dentin bonds. **Operative Dentistry**, v. 34, n. 4, p. 481-490, 2009.

STANISLAWCZUK, R.; REIS, A.; LOGUERCIO, A.D. A 2-year in vitro evaluation of a chlorhexidine-containing acid on the durability of resin–dentin interfaces. **Journal of Dentistry**, v. 39, n. 1, p. 40-47, 2011.

TAY, F.R.; PASHLEY, D.H.; YOSHIYAMA, M. Two modes of nanoleakage expression in single-step adhesives. **Journal of Dental Research**, v. 81, n. 7, p. 472-476, 2002.

TEN CATE, A.R. **Histologia Bucal: desenvolvimento, estrutura e função**. 5. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2001, 439p.

TJÄDERHANE L. et al. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. **Journal of Dental Research**, v. 77, n. 8, p. 1622-1629, 1998.

VAN MEERBEEK, B. et al. The clinical performance of adhesives. **Journal of Dentistry**, v. 26, n. 1, p. 1-20, 1998.

VAN MEERBEEK, B. et al. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. **Operative Dentistry**, v. 28, n. 3, p. 215-235, 2003.

VAN MEERBEEK, B. The “myth” of nanoleakage. **Journal of Adhesive Dentistry**, v. 9, n. 6, p. 491-492, 2007.

VIEIRA, R.S.; DA SILVA JR, I.A. Bond strength to primary tooth dentin following disinfection with a chlorhexidine solution: an *in vitro* study. **Pediatric Dentistry**, v. 25, n. 1, p. 49-52, 2003.

WANG, Y.; SPENCER, P. Quantifying adhesive penetration in adhesive/dentin interface using confocal Raman microspectroscopy. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 59, n. 1, p. 46-55, 2002.

WANG, Y.; SPENCER, P. Hybridization, efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. **Journal of Dental Research**, v. 82, n. 2, p. 141-145, 2003.

WANG, Y; SPENCER, P. Physiochemical interactions at the interfaces between self-etch adhesive systems and dentine. **Journal of Dentistry**, v. 32, n. 7, p. 567-579, 2004.

WATANABE, I. NAKABAYASHI, N. PASHLEY, D.H. Bonding to ground dentin by a phenyl-p self-etching primer. **Journal of Dental Research**, v. 73, n. 6, p. 1212-1220, 1994.

ZHANG, S.C.; KERN, M. The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives. **International Journal of Oral Science**, v. 1, n. 4, p. 163-176, 2009.

ZHOU, J. et al. The incorporation of chlorhexidine in a two-step self-etching adhesive preserves dentin bond *in vitro*. **Journal of Dentistry**, v. 37, n. 10, p. 807-812, 2009.

ZHOU, J. et al. Effect of chlorhexidine application in a self-etching adhesive on the immediate resin-dentin bond strength. **The Journal of Adhesive Dentistry**, v. 12, n. 1, p. 27-31, 2010.

¹ Baseada na NBR-6023 de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA****Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Meu nome é Karin Faust Souza e estou desenvolvendo a pesquisa intitulada “Avaliação de sistemas adesivos em dentina decídua: influência da clorexidina 2% na resistência à microtração”.

O objetivo desta pesquisa é verificar se os materiais usados para unir (“colar”) a restauração ao dente, aderem-se bem a ele, determinando assim, se esses materiais conseguem suportar a força da mordida e não vão se quebrar, de maneira que possam ser utilizados. E também, se a aplicação de clorexidina 2% (utilizada para aumentar a durabilidade da restauração) influencia nesta união.

O(s) dente(s) de seu filho(a) não está(ão) sendo extraído(s) para se fazer esta pesquisa, mas por outros motivos (traumatismo que impossibilite a recuperação do dente, finalidade ortodôntica, esfoliação – “queda” natural do dente). Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais que seu filho (a) faça parte do mesmo, pode entrar em contato pelo telefone (48) 3052-3993 ou 9919-1993 e falar com a dentista Karin Faust Souza. Se você estiver de acordo em participar, esclarecemos que os dentes coletados serão utilizados somente neste trabalho, não servindo para nenhuma outra pesquisa biológica ou genética.

Nome da criança: _____

Nome do responsável: _____

Notação dental: _____

Declaro estar ciente que estou doando o órgão dental para finalidade de pesquisa, e estar ciente, também, que o doador e o responsável não terão qualquer benefício ou remuneração pela participação na presente pesquisa,

Data : ____/____/____.

Assinatura do responsável pelo doador_____
Assinatura Pesquisadora
Karin Faust Souza_____
Assinatura Orientadora
Izabel Cristina Santos Almeida

APÊNDICE B – Metodologia expandida

1 Aspectos éticos

Primeiros e segundos molares decíduos humanos hígidos, extraídos por motivos alheios a esta pesquisa, há no máximo 6 meses, e armazenados em solução de timol a 0,1% em soro fisiológico 0,9%, com pH=7,0, em temperatura ambiente, foram utilizados com o consentimento livre e esclarecido dos pais ou responsáveis pelos pacientes (APÊNDICE A). Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina / Protocolo nº 931/10 (ANEXO A).

2 Delineamento experimental

Esta é uma pesquisa *in vitro* na qual se avaliou a influência da aplicação de digluconato de clorexidina 2% na resistência de união de dois sistemas adesivos em dentina de dentes decíduos, através do ensaio de microtração e análise da interface dentina-adesivo em microscopia eletrônica de varredura (MEV), conforme figura 1.

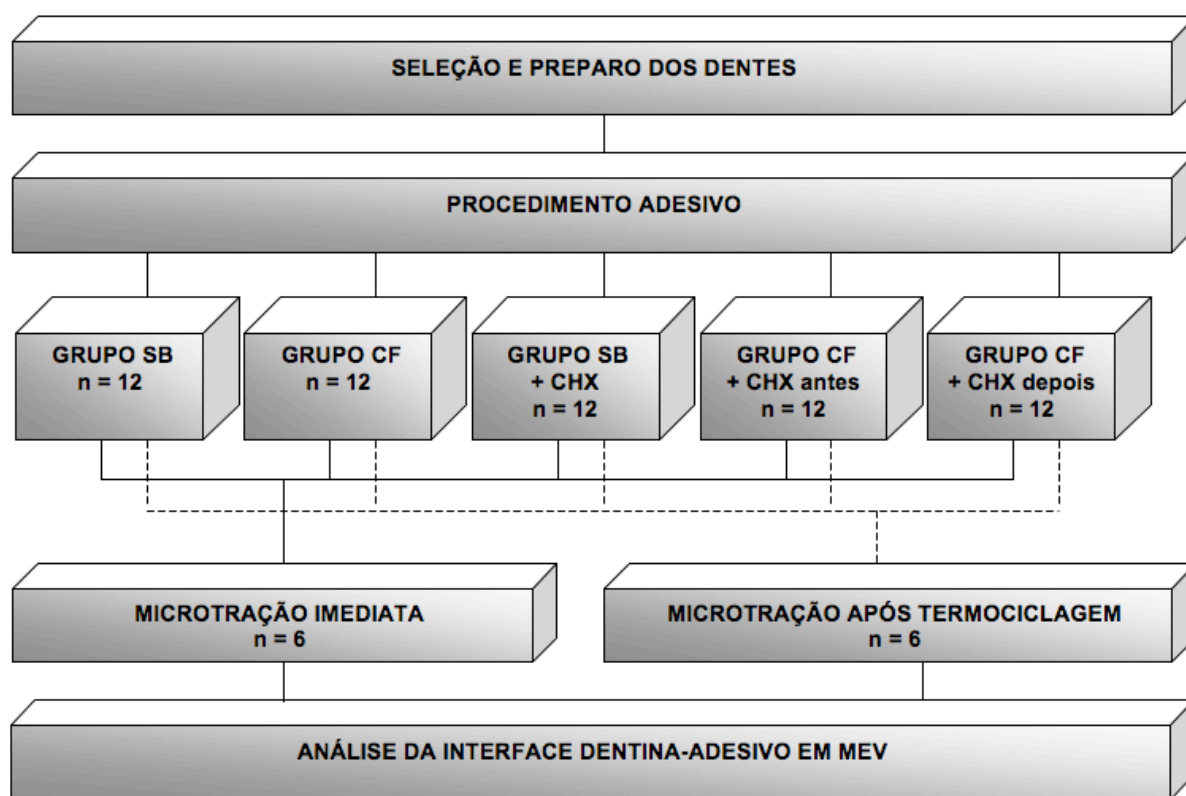


Figura 1. Fluxograma representando as etapas experimentais realizadas no estudo: SB: Adper Single Bond 2; CF: Clearfil SE Bond; SB + CHX: Adper Single Bond 2 + clorexidina; CF + CHX antes: Clearfil SE Bond + clorexidina antes do *primer* ácido.; CF + CHX depois: Clearfil SE Bond + clorexidina depois do *primer* ácido.

3 Seleção e preparo dos dentes

Os dentes foram limpos com curetas, escovas Robinson e água, e analisados em uma lupa estereoscópica (10X), selecionando-se 60 molares decíduos livres de cárie e defeitos estruturais no esmalte (figura 2). A região a ser utilizada para as análises foi a superfície oclusal dos dentes.

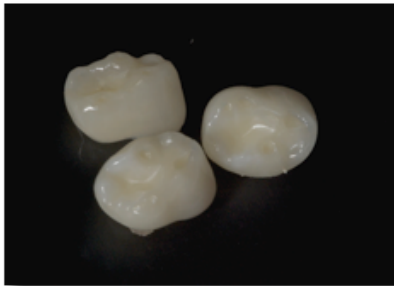


Figura 2. Molares decíduos hígidos utilizados no estudo.

As raízes, quando presentes, foram desgastadas até aproximadamente 2mm aquém da junção cimento-esmalte, utilizando-se lixa de carbetto de silício (SiC) n°220 (3M do Brasil, Sumaré, SP, Brasil), em politriz (Panambra Struers DP-10, Panambra, São Paulo, Brasil), sob refrigeração com água. Na sequência, fez-se a remoção do tecido pulpar remanescente e, a câmara pulpar foi preenchida com resina composta Renamel, cor azul (Cosmedent, Chicago, IL, EUA) (figura 4), para diferenciar da área de adesão principal e reforçar os dentes durante o seccionamento dos corpos de prova (MIRANDA et al., 2010). Para isso, foi realizado o condicionamento com ácido fosfórico 35% (Ultra-Etch, Ultradent, South Jordan, UT, EUA) (figura 3a) e aplicado o sistema adesivo Adper Scotchbond Multi-Purpose (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) segundo a recomendação do fabricante (figuras 3b e c).

Figura 3. a) Condicionamento da câmara pulpar com ácido fosfórico 35%. b) Aplicação do sistema adesivo com pincel descartável. c) Sistema adesivo Adper Scotchbond Multi-Purpose.

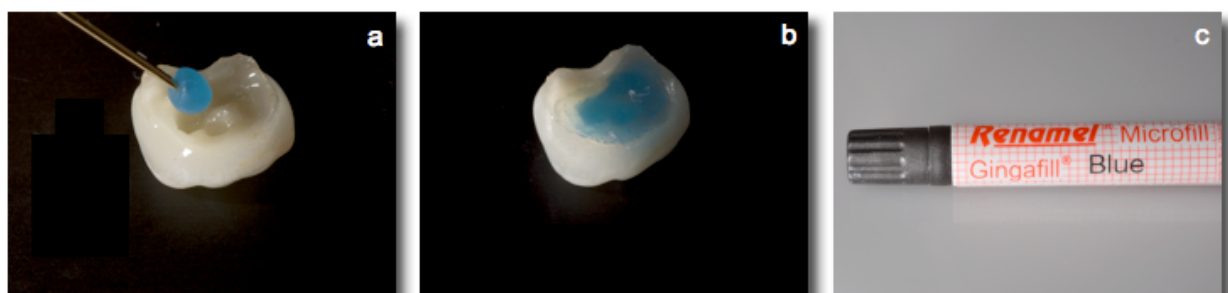


Figura 4. a) Preenchimento da câmara pulpar com resina composta. b) Câmara pulpar preenchida. c) Resina composta Renamel, cor azul.

Após o preenchimento da câmara pulpar, aplicou-se resina composta Filtek Z250 (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) para que cada dente ficasse aproximadamente 3mm maior no seu longo eixo, para reproduzir parte da raiz e, desta forma, facilitar os demais procedimentos (figura 5).

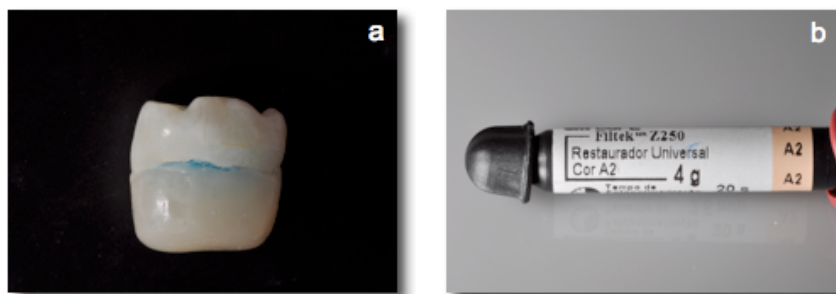


Figura 5. a) Resina composta aplicada para reproduzir parte da raiz: aproximadamente 3mm. b) Resina composta Filtek Z250.

Na seqüência, as coroas dos dentes foram isoladas com cera utilidade para inclusão da porção radicular em resina acrílica, em tubos de PVC (25 x 20mm) isolados com vaselina (figura 6a). Concluída a polimerização, os espécimes foram removidos dos tubos de PVC e a cera utilidade foi removida com gaze das superfícies oclusais (figura 6b).

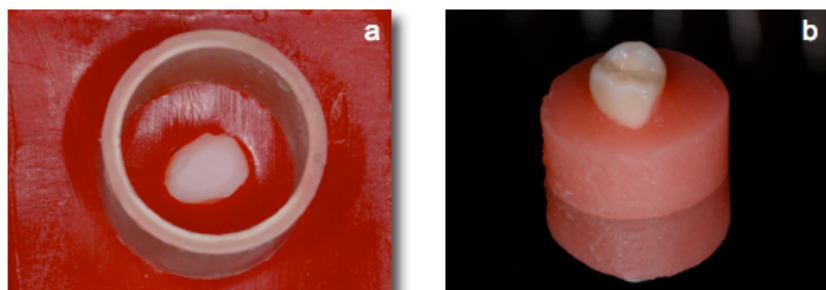


Figura 6. a) Isolamento da coroa dental com cera utilidade para inclusão da porção radicular em tubo de PVC. b) Dente após embutimento com resina acrílica.

Posteriormente, a superfície oclusal foi desgastada com lixa de SiC n°220, sob refrigeração com água, para exposição da dentina. Para confirmar a ausência de esmalte, os espécimes foram secos com jato de ar e examinados com lupa estereoscópica (10X). Após, foi realizada a regularização da superfície e padronização da lama dentinária, com auxílio de lixas de SiC n°400 e 600, em politriz, sob refrigeração com água, em 4 diferentes posições, durante 10s cada, totalizando 40s por espécime (figura 7).

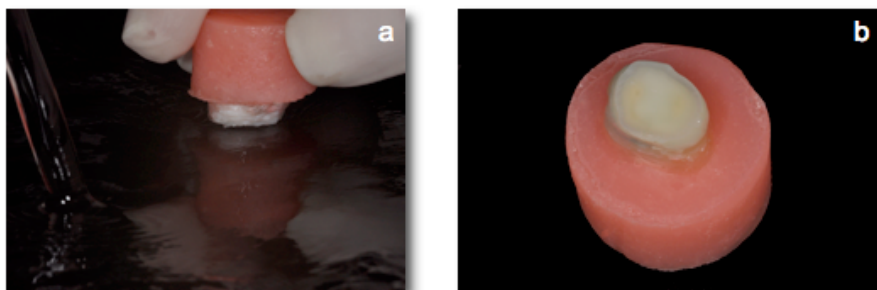


Figura 7. a) Desgaste da superfície oclusal com lixas de carbeto de silício (n°220, 400 e 600). b) Espécime após planificação da superfície oclusal.

4 Procedimento adesivo

Os espécimes foram lavados com água destilada, secos com ar comprimido, e distribuídos, aleatoriamente, em 5 grupos (n=12) conforme o sistema adesivo utilizado

e protocolo de aplicação da solução de digluconato de clorexidina 2% (FGM, Joinville, SC, Brasil - lote: 120710).

Os sistemas adesivos foram utilizados de acordo com as recomendações dos fabricantes (figuras 8 e 9), diferindo apenas em relação à aplicação de CHX:

- Grupo SB: condicionamento com ácido fosfórico 35% (Ultra-Etch, Ultradent, South Jordan, UT, EUA) + aplicação do sistema adesivo Adper Single Bond 2 (3M ESPE, Sumaré, SP, Brasil);
- Grupo CF: aplicação do sistema adesivo Clearfil SE Bond (Kuraray, New York, NY, EUA) (*primer* + adesivo);
- Grupo SB + CHX: condicionamento com ácido fosfórico 35% + aplicação de digluconato de clorexidina 2% + aplicação do sistema adesivo Adper Single Bond 2;
- Grupo CF + CHX antes: aplicação de digluconato de clorexidina 2% + aplicação do sistema adesivo Clearfil SE Bond (*primer* + adesivo);
- Grupo CF + CHX depois: aplicação do *primer* do Clearfil SE Bond + aplicação de digluconato de clorexidina 2% + aplicação do adesivo do Clearfil SE Bond.



Figura 8. a) Sistema adesivo Adper Single Bond 2. b) Aplicação do sistema adesivo com pincel descartável.

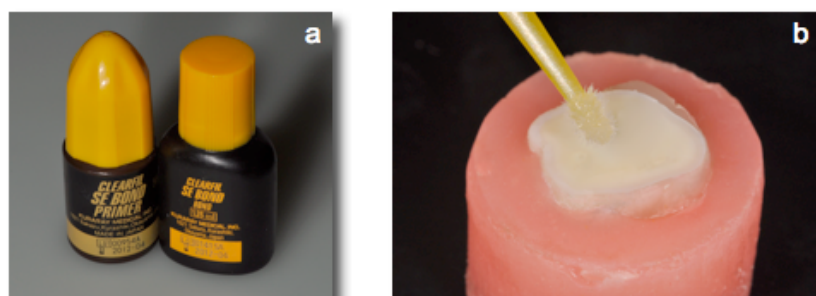


Figura 9. a) Sistema adesivo Clearfil SE Bond. b) Aplicação do sistema adesivo com pincel descartável.

A aplicação da solução de digluconato de clorexidina 2% foi feita com pincel descartável (figura 10) durante 60s e, posteriormente, realizou-se secagem com papel absorvente.

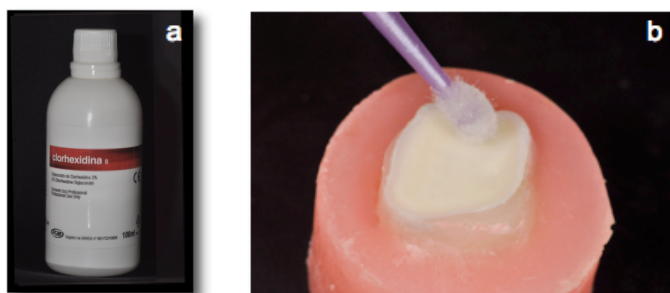


Figura 10. a) Solução de digluconato de clorexidina 2%. b) Aplicação da solução com pincel descartável.

Após a aplicação dos sistemas adesivos e fotopolimerização, a resina composta Filtek Z350 XT (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA), cor A2D (figura 11), foi inserida em 3 incrementos (figuras 12a e c), de 1,5mm de espessura, sendo cada incremento fotopolimerizado por tempo recomendado pelo fabricante (40s). A fotopolimerização foi realizada com aparelho LED (Ultra Lume, Ultradent, South Jordan, UT, EUA) (figura 12b), com intensidade de luz de 1095mW/cm^2 , aferida a cada 5 dentes com radiômetro (SDS-Kerr 910726, Kerr Corporation, CT, EUA).

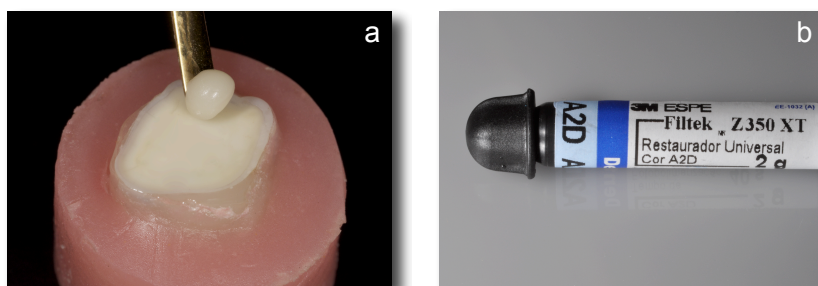


Figura 11. a) Aplicação da resina composta. b) Resina composta Filtek Z350 XT, cor A2D.

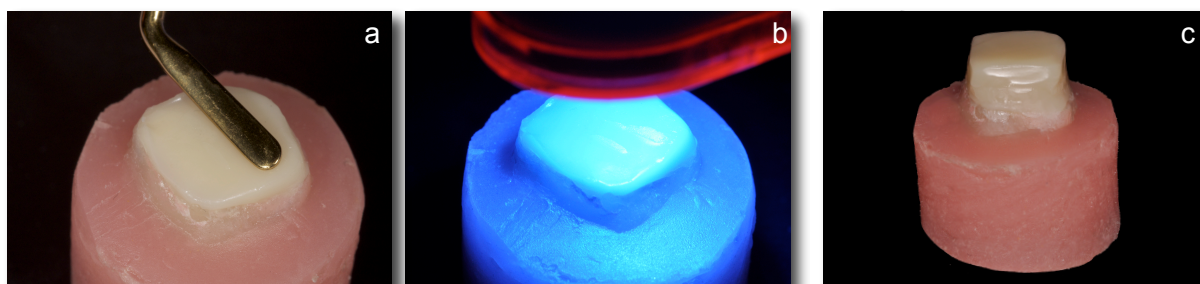


Figura 12. a) Aplicação da resina composta em incrementos de aproximadamente 1,5mm. b) Fotopolimerização realizada com aparelho LED. c) Espécime com 3 incrementos de resina.

Os espécimes foram armazenados em água destilada a 37°C , em estufa microbiológica, por 24h. Posteriormente, foram subdivididos aleatoriamente em 2 grupos ($n=6$): análise imediata (IM) e análise após termociclagem (TC).

A termociclagem foi utilizada de acordo com as recomendações da ISO 11405 standard (2003), como forma de relativo envelhecimento dos corpos de prova, sendo utilizada para submeter a restauração aos limites de temperatura semelhantes aos experimentados na cavidade oral (KORKMAZ et al., 2010). A ciclagem térmica foi realizada em uma máquina específica (Ética Equipamento Científicos S/A, São Paulo, SP, Brasil) (figura 13a). Os espécimes foram distribuídos em invólucros de tecido sintético (5530, Lupo, Araraquara, SP, Brasil) de diferentes cores para identificação dos grupos (figura 13b), e colocados no recipiente móvel da máquina (figura 13c),

alternando-se em banhos de 5°C (± 2) e 55°C (± 2), totalizando 500 ciclos (EL KALLA; GARCIA-GODOY, 1998; KORKMAZ et al., 2010). Os dentes permaneceram 30s em cada banho, com um tempo de transferência de 3s, perfazendo um ciclo em 66s.



Figura 13. a) Máquina específica para termociclagem. b) Espécimes distribuídos em invólucros de tecido sintético de diferentes cores para identificação dos grupos. c) Recipiente móvel da máquina contendo os espécimes.

Subseqüentemente à armazenagem por 24 horas ou à termociclagem, os espécimes foram fixados, individualmente, com adesivo a base de cianoacrilato (Super Bonder, Henkel Loctite Adesivos Ltda., Itapevi, SP, Brasil), em suporte acrílico. Na seqüência, foram posicionados em uma máquina de corte (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) para realização de secções em sentido longitudinal (perpendicularmente à interface adesiva), com disco diamantado com 0,3mm de espessura (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), com velocidade de 250rpm, sob refrigeração com água (figura 14a). Foram feitas secções no sentido mésio-distal, de forma a serem obtidas fatias dos espécimes. Posteriormente, foi realizada aplicação de cera pegajosa em toda a sua extensão, e foram confeccionadas as secções no sentido vestibulo-lingual, para obtenção de palitos com área de secção transversal de aproximadamente 0,8mm² (figuras 14b e c).

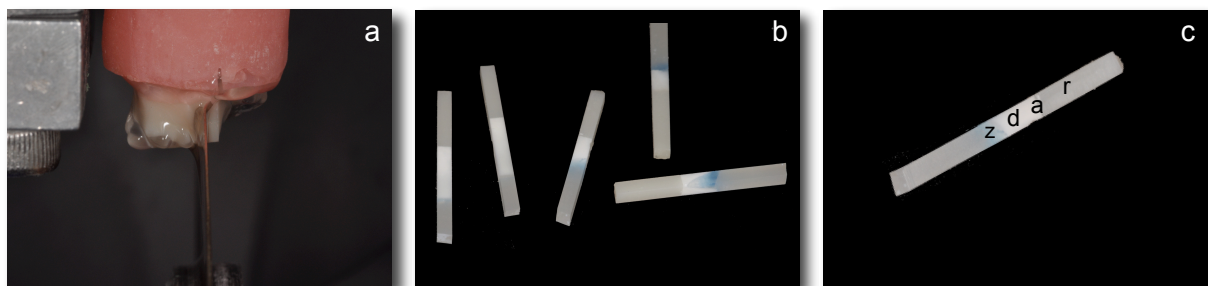


Figura 14. a) Realização das secções na máquina de corte. a) Palitos resultantes dos cortes realizados. b) Identificação: z - resina composta cor azul; d - dentina; a - interface adesiva; r - resina composta.

5 Resistência de união pelo teste de microtração

Inicialmente, a área de secção transversal de cada corpo de prova foi mensurada com paquímetro digital (Modelo 727, Starett, Itu, SP, Brasil) (figura 15).

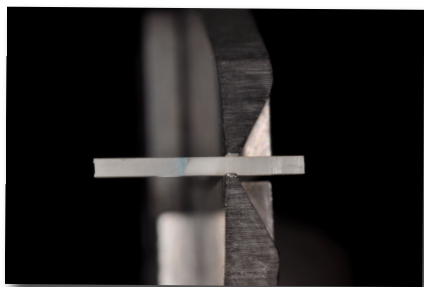


Figura 15. Área de secção transversal do corpo de prova sendo aferida com paquímetro digital (aproximadamente 0,8 mm²).

Os palitos foram fixados, com adesivo de cianoacrilato, em dispositivos de Geraldelli (figura 16a). Esses dispositivos foram adaptados em uma máquina de ensaios (Modelo 4444, Instron Corp., Canton, MA, EUA), que foi movimentada no sentido de tração, para fraturar os corpos de prova, com velocidade de 0,5mm/min (figura 16b).

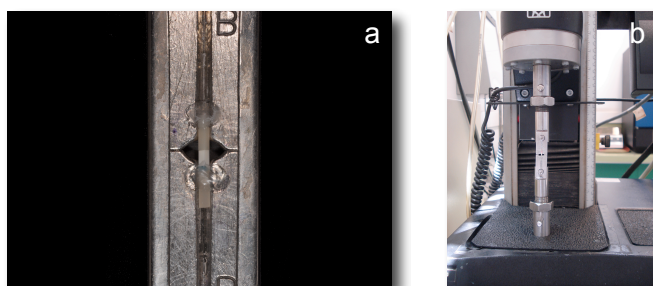


Figura 16. a) Palito fixado no dispositivo de Geraldelli e posicionado para ensaio de microtração. b) Teste de microtração sendo realizado em máquina de ensaios Instron.

Os valores de resistência adesiva foram calculados em megapascals (MPa) dividindo-se a carga aplicada (N) pela área de secção transversal do palito (mm²):

$$\mu\text{TBS}(\text{MPa}) = \text{carga aplicada}(\text{N}) / \text{área}(\text{mm}^2)$$

6 Avaliação do padrão de fratura após o teste de microtração

Para verificar o tipo de falha ocorrida, cada corpo de prova foi avaliado em microscópio óptico (LEICA DM 4000M, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Alemanha) em aumento de 50X, sendo classificadas como segue – adaptado de Sardella et al. (2005):

- Coesiva: a) Resina Composta: quando houve fratura na resina composta;
b) Dentina: quando a falha ocorreu na estrutura da dentina.
- Adesiva: quando a falha ocorreu entre adesivo e dentina.
- Mista: a falha foi uma composição dos tipos coesiva e adesiva.

7 Análise da interface dentina/adesivo em MEV

Uma amostra representativa das fatias externas, obtidas pela primeira orientação de corte durante o preparo para o teste de microtração, foi preparada para análise da interface dentina-adesivo em microscopia eletrônica de varredura (MEV), de acordo com Kaaden, Schmalz e Powers (2003).

Realizou-se a fixação dos espécimes em 2,5% glutaraldeído tamponado com 0,2mol/L de cacodilato de sódio (Dermus Farmácia de Manipulação, Florianópolis, SC, Brasil), durante 12h, a 4°C. Na seqüência, foi feita uma lavagem em 0,2mol/L de tampão de cacodilato de sódio (Dermus Farmácia de Manipulação, Florianópolis, SC, Brasil), durante 1h, com duas trocas da solução (3 x 20min). Posteriormente, os espécimes foram submetidos a uma lavagem com água deionizada (Dermus Farmácia de Manipulação, Florianópolis, SC, Brasil) por 1min, seguida por desidratação em concentrações ascendentes de álcool etílico: 25%, 50%, 75% por 20min cada um, 95% por 30min e 100% por 60min (Flor de Anis Farmácia de Manipulação, Florianópolis, SC, Brasil). Os espécimes foram então, secos através da imersão em HMDS (Hexamethyldisilazane Reagent, Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, EUA), durante 10min e, posteriormente, colocados em papel absorvente e secos ao ar em temperatura ambiente.

As amostras foram embutidas em resina de poliéster (Maxi Rubber, Diadema, SP, Brasil) e armazenadas por 12h em estufa a 37°C. Foi realizado o acabamento das amostras embutidas, com auxílio de lixas de SiC de granulação decrescente, por 30s em cada lixa (n°220, 400, 600 e 1200). O polimento foi feito com pastas de alumina de 1 e 0,5µm (Arotec S.A. Indústria e Comércio, Cotia, SP, Brasil), por 1 e 5min, respectivamente. Os espécimes foram submetidos a um banho de ultra-som (Ultrasonic Cleaner 1440D; Odontobrás, Ribeirão Preto, SP, Brasil) em álcool etílico 100%, durante 5min e à desmineralização com imersão em 6mol/L de HCl (Flor de Anis Farmácia de Manipulação, Florianópolis, SC, Brasil), durante 30s, sendo posteriormente lavados com água deionizada. Na seqüência, os espécimes foram desproteinizados com imersão em 2% de NaOCl (Flor de Anis Farmácia de Manipulação, Florianópolis, SC, Brasil), durante 10min, seguida de lavagem em água deionizada e secagem, para posterior recobrimento com ouro.

8 Análise estatística

Os padrões de fratura foram avaliados de forma descritiva. Foram considerados, para análise estatística, os valores encontrados nos corpos de prova que apresentaram fraturas classificadas como adesivas. As fraturas que ocorreram visivelmente fora da área de adesão, em dentina ou em resina, não participaram do estudo, por não representarem uma mensuração da resistência adesiva (DE ANDRADE et al., 2010).

As médias das áreas de secção transversal dos corpos de prova incluídos na análise, foram calculadas para cada dente e submetidas à ANOVA fatorial e Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para o teste de microtração, foram calculadas as médias para cada dente em cada grupo experimental. Os valores de resistência de união foram submetidos à ANOVA fatorial (tratamento x adesivo x tempo) e Teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados do teste de microtração foram calculados considerando-se o dente como unidade experimental, para que as variáveis internas na dentina de cada elemento dental não interferissem nas avaliações (LOGUERCIO et al., 2005; ECKERT; PLATT, 2007; VAN MEERBEECK, 2007).

APÊNDICE C – Análise estatística

1 Área de adesão

Valores médios da área de secção transversal (mm²) dos palitos com falha adesiva, por dente:

Tempo	Clorexidina	Adesivo	n	Média (mm ²)	Desvio padrão
Imediato	-	Single Bond	6	0,84	0,09
	-	Clearfil	6	0,76	0,07
	sim	Single Bond	6	0,77	0,05
	sim	Clearfil AP	6	0,79	0,04
	sim	Clearfil DP	6	0,82	0,08
Termociclagem	-	Single Bond	5	0,82	0,06
	-	Clearfil	3	0,83	0,05
	sim	Single Bond	6	0,85	0,03
	sim	Clearfil AP	5	0,83	0,04
	sim	Clearfil DP	6	0,82	0,06

1.1 Normalidade

Teste para verificar a normalidade (Kolmogorov-Smirnov & Lilliefors test for normality, valor de $p > 0,05$ = normalidade) - resultado: K-S $d = 0,09292$, $p > 0,20$; Lilliefors $p > 0,20$.

1.2 Teste ANOVA FATORIAL: sem diferença.

Fator	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado Médio	F	p
Tempo	0,01239	1	0,01239	2,886	0,095967
Adesivo	0,00726	3	0,00242	0,563	0,641782
Tempo*Adesivo	0,00331	3	0,00110	0,257	0,855750
Tratamento	0,00011	1	0,00011	0,027	0,870825
Tempo	0,01291	1	0,01291	3,077	0,085400
Tratamento*Tempo	0,00066	1	0,00066	0,156	0,694304

2 Microtração

Valores médios dos palitos com falha adesiva, por dente (variáveis: tempo, uso de clorexidina e adesivo):

Tempo	Clorexidina	Adesivo	n	Média (mPa)	Desvio padrão
24h	-	Single Bond	6	38,10	7,01
	-	Clearfil	6	45,44	4,77
	sim	Single Bond	6	39,13	10,25
	sim	Clearfil AP	6	44,56	10,65
	sim	Clearfil DP	6	40,92	10,61
Termociclagem	-	Single Bond	5	37,33	11,79
	-	Clearfil	3	43,20	29,91
	sim	Single Bond	6	39,86	7,59
	sim	Clearfil AP	5	32,82	14,86
	sim	Clearfil DP	6	39,75	12,42

2.1 Normalidade

Teste para verificar a normalidade (Kolmogorov-Smirnov & Lilliefors test for normality, valor de $p > 0,05$ = normalidade) – resultado: K-S $d=0,08544$, $p > 0,20$; Lilliefors $p > 0,20$.

2.2 Teste ANOVA FATORIAL: sem diferença

Tempo X Adesivo X Tratamento

Fator	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado Médio	F	p
Tempo	125,49	1	125,49	0,8834	0,353719
Adesivo	85,81	1	85,81	0,6041	0,442252
Tratamento	37,80	1	37,80	0,2661	0,609212
Tempo*Adesivo	124,13	1	124,13	0,8738	0,356302
Tempo*Tratamento	40,87	1	40,87	0,2877	0,595080
Adesivo*Tratamento	140,15	1	140,15	0,9866	0,327389
Tempo*Adesivo*Tratamento	77,30	1	77,30	0,5442	0,465633

Antes do primer X Depois do primer

Fator	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado Médio	F	p
Tempo	238,22	1	238,22	1,6243	0,217854
Adesivo	15,43	1	15,43	0,1052	0,749193
Tempo*Adesivo	159,71	1	159,71	1,0890	0,309790

2.3 Teste de Tukey: sem diferença

Tempo X Adesivo X Tratamento

	Tempo	Adesivo	Tratamento	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
1	Imediato	SB	Sem CHX		1,000000	0,959661	0,979848	1,000000	0,999996	0,998629	0,995377
2	Imediato	SB	CHX	1,000000		0,982401	0,992686	0,999996	1,000000	0,999691	0,986567
3	Imediato	CF	Sem CHX	0,959661	0,982401		1,000000	0,947160	0,991432	0,999995	0,656851
4	Imediato	CF	CHX	0,979848	0,992686	1,000000		0,971126	0,996998	1,000000	0,731254
5	TC	SB	Sem CHX	1,000000	0,999996	0,947160	0,971126		0,999964	0,997241	0,998718
6	TC	SB	CHX	0,999996	1,000000	0,991432	0,996998	0,999964		0,999918	0,975030
7	TC	CF	Sem CHX	0,998629	0,999691	0,999995	1,000000	0,997241	0,999918		0,928774
8	TC	CF	CHX	0,995377	0,986567	0,656851	0,731254	0,998718	0,975030	0,928774	

Antes do *primer* X Depois do *primer*

	Tempo	Adesivo	{1}	{2}	{3}	{4}
1	Imediato	Clearfil AP		0,953044	0,401509	0,900308
2	Imediato	Clearfil DP	0,953044		0,691209	0,998334
3	TC	Clearfil AP	0,401509	0,691209		0,781369
4	TC	Clearfil DP	0,900308	0,998334	0,781369	

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – UFSC

Certificado

http://www.reitoria.ufsc.br/~hpcep/projeto_cep/cer...

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CERTIFICADO Nº 931

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA Nº 0584/GR-99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o contido no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

APROVADO

PROCESSO: 931 FR: 362726

TÍTULO: Avaliação de sistemas adesivos em dentina decídua: influência da clorexidina 2% na resistência à microtração

AUTOR: Izabel Cristina Santos Almeida, Karin Faust Souza

FLORIANÓPOLIS, 30 de Agosto de 2010.

Coordenador do CEPSH UFSC

Profª Magda Santos Koerich
Subcoordenadora
CEPSH/PRPE/UFSC

ANEXO B – Normas para publicação do artigo

International Journal of Paediatric Dentistry

Author Guide

Content of Author Guidelines: 1. General, 2. Ethical Guidelines, 3. Manuscript Submission Procedure, 4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure, 6. After Acceptance.

Relevant Documents: Sample Manuscript, Exclusive Licence Form

Useful Websites: Submission Site, Articles published in International Journal of Paediatric Dentistry, Author Services, Wiley-Blackwell's Ethical Guidelines, Guidelines for Figures.

1. GENERAL

International Journal of Paediatric Dentistry publishes papers on all aspects of paediatric dentistry including: growth and development, behaviour management, prevention, restorative treatment and issue relating to medically compromised children or those with disabilities. This peer-reviewed journal features scientific articles, reviews, clinical techniques, brief clinical reports, short communications and abstracts of current paediatric dental research. Analytical studies with a scientific novelty value are preferred to descriptive studies.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after acceptance of a manuscript for publication in *International Journal of Paediatric Dentistry*. Authors are encouraged to visit Wiley-Blackwell Author Services for further information on the preparation and submission of articles and figures.

In June 2007 the Editors gave a presentation on How to write a successful paper for the *International Journal of Paediatric Dentistry*.

2. ETHICAL GUIDELINES

2.1 Authorship and Acknowledgements

Authorship: Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript have been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal.

International Journal of Paediatric Dentistry adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria authorship should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Please also include specifications of the source of funding for the study and any potential conflict of interests if appropriate.

Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

Note to NIH Grantees: Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to Pub Med Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association **Declaration of Helsinki** (version, 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

2.3 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

International Journal of Paediatric Dentistry encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

2.4 DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations

Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

2.5 Conflict of Interest and Source of Funding

Authors are required to specify the source of funding for their research when submitting a paper. Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included. Authors are also required to disclose any possible conflict of interest. These include financial conflict of interest (for example patent, ownership, stock ownership, consultancies, speaker's fee). The information should be disclosed under Acknowledgements.

2.6 Appeal of Decision

Authors who wish to appeal the decision on their submitted paper may do so by emailing the editorial office with a detailed explanation for why they find reasons to appeal the decision.

2.7 Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

2.8 Copyright Assignment

Authors are no longer required to assign copyright in their paper. Instead authors are required to assign the exclusive licence to publish their paper to Wiley-Blackwell, BSPD and the IAPD. Assignment of the exclusive licence is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless licence has been assigned. (Papers subject to government or Crown copyright are exempt from this requirement; however, the form still has to be signed). A completed Exclusive Licence Form (ELF) must be received by the Production Editor before any manuscript can be published. Authors must send the completed original CTA by regular mail upon receiving notice of manuscript acceptance, i.e., do not send the CTA at submission. Faxing or e-mailing the CTA does not meet requirements.

The CTA should be mailed to:

Enrico Jay Ventura
Production Editor
Wiley-Blackwell
Wiley Services Singapore Pte Ltd
600 North Bridge Road
#05-01 Parkview Square
Singapore 188778
or scanned by email to ipd@wiley.com

Correspondence to the journal is accepted on the understanding that the contributing author licences the publisher to publish the letter as part of the journal or separately from it, in the exercise of any subsidiary rights relating to the journal and its contents.

For questions concerning copyright, please visit [Wiley-Blackwell's Copyright FAQ](#)

2.9 Online Open

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley InterScience, as well as deposited in the funding agency's preferred archive.

For the full list of terms and conditions, see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms.

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: <https://wileyonlinelibrary.com/onlineopen>

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Articles for the *International Journal of Paediatric Dentistry* should be submitted electronically via an online submission site. Full instructions and support are available on the site and a user ID and password can be obtained on the first visit. Support is available by phone (+1 434 817 2040 ext. 167) or [here](#). If you cannot submit online, please contact Isabel Martinez in the Editorial Office by telephone (+44 (0)1865 476519) or by e-mail IPDedoffice@wiley.com

3.1. Getting Started

Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 5.5 or higher, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4 or higher) and go to the journal's online submission site: <http://mc.manuscriptcentral.com/ijpd>

*Log-in or, if you are a new user, click on 'register here'.

*If you are registering as a new user.

- After clicking on 'Create Account', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.

- Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'

- Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise. Click 'Finish'.

*If you are already registered, but have forgotten your log in details, enter your e-mail address under 'Password Help'. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.

*Log-in and select 'Author Center'.

3.2. Submitting Your Manuscript

After you have logged into your 'Author Center', submit your manuscript by clicking on the submission link under 'Author Resources'.

* Enter data and answer questions as appropriate.

* You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter. **Please note** that a separate *Title Page* must be submitted as part of the submission process as a 'Supplementary File Not for Review' and should contain the following:

- Word count (excluding tables)
- Authors' names, professional and academic qualifications, positions and places of work. They must all have actively contributed to the overall design and execution of the study/paper and should be listed in order of importance of their contribution
- Corresponding author address, and telephone and fax numbers and email address

* Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.

* You are required to upload your files.

- Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.

- Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.

- When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.

* Review your submission (in HTML and PDF format) before completing your submission by sending it to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and a PDF document on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below. Please note that any manuscripts uploaded as Word 2007 (.docx) will be automatically rejected. Please save any.docx file as .doc before uploading.

3.4. Review Process

The review process is entirely electronic-based and therefore facilitates faster reviewing of manuscripts. Manuscripts will be reviewed by experts in the field (generally two reviewers), and the Editor-in-Chief makes a final decision. *The International Journal of Paediatric Dentistry* aims to forward reviewers' comments and to inform the corresponding author of the result of the review process. Manuscripts will be considered for 'fast-track publication' under special circumstances after consultation with the Editor-in-Chief.

3.5. Suggest a Reviewer

International Journal of Paediatric Dentistry attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, please suggest the names and current email addresses of a potential international reviewer whom you consider capable of reviewing your manuscript and their area of expertise. In addition to your choice the journal editor will choose one or two reviewers as well.

3.6. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

3.7. E-mail Confirmation of Submission

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation e-mail after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our e-mail server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

3.8. Manuscript Status

You can access ScholarOne Manuscripts any time to check your 'Author Center' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

3.9. Submission of Revised Manuscripts

Revised manuscripts must be uploaded within 2 months of authors being notified of conditional acceptance pending satisfactory revision. Locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision' to submit your revised manuscript. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript. All revisions must be accompanied by a cover letter to the editor. The letter must a) detail on a point-by-point basis the author's response to each of the referee's comments, and b) a revised manuscript highlighting exactly what has been changed in the manuscript after revision.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original Articles: Divided into: Summary, Introduction, Material and methods, Results, Discussion, Bullet points, Acknowledgements, References, Figure legends, Tables and Figures arranged in this order. The summary should be structured using the following subheadings: Background, Hypothesis or Aim, Design, Results, and Conclusions and should be less than 200 words. A brief description, in bullet form, should be included at the end of the paper and should describe What this paper adds and Why this paper is important to paediatric dentists.

Review Articles: may be invited by the Editor.

Short Communications: should contain important, new, definitive information of sufficient significance to warrant publication. They should not be divided into different parts and summaries are not required.

Clinical Techniques: This type of publication is best suited to describe significant improvements in clinical practice such as introduction of new technology or practical approaches to recognised clinical challenges.

Brief Clinical Reports: Short papers not exceeding 800 words, including a maximum of three illustrations and five references may be accepted for publication if they serve to promote communication between clinicians and researchers. In contrast to original articles, contributions to this section will not undergo peer-review but will be assessed by the editorial team. If the paper describes a genetic disorder, the OMIM unique six-digit number should be provided for online cross reference (Online Mendelian Inheritance in Man).

A paper submitted as a Brief Clinical Report should include the following:

- a short **Introduction** (avoid lengthy reviews of literature);
- the **Case report** itself (a brief description of the patient/s, presenting condition, any special investigations and outcomes);
- a **Comment** which should highlight specific aspects of the case(s), explain/interpret the main findings and provide a scientific appraisal of any previously reported work in the field.

Letters to the Editor: Should be sent directly to the editor for consideration in the journal.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Format Language:

The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscript is professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication

5.2. Structure The whole manuscript should be double-spaced, paginated, and submitted in correct English. The beginning of each paragraph should be properly marked with an indent.

Original Articles (Research Articles): should normally be divided into: Summary, Introduction, Material and methods, Results, Discussion, Bullet points, Acknowledgements, References, Figure legends, Tables and Figures arranged in this order.

Summary should be structured using the following subheadings: Background, Hypothesis or Aim, Design, Results, and Conclusions.

Introduction should be brief and end with a statement of the aim of the study or hypotheses tested. Describe and cite only the most relevant earlier studies. Avoid presentation of an extensive review of the field.

Material and methods should be clearly described and provide enough detail so that the observations can be critically evaluated and, if necessary repeated. Use section subheadings in a logical order to title each category or method. Use this order also in the results section. Authors should have considered the ethical aspects of their research and should ensure that the project was approved by an appropriate ethical committee, which should be stated. Type of statistical analysis must be described clearly and carefully.

(i) Experimental Subjects: Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

(ii) Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

International Journal of Paediatric Dentistry encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

(iii) DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations: Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

Results should clearly and concisely report the findings, and division using subheadings is encouraged. Double documentation of data in text, tables or figures is not acceptable. Tables and figures should not include data that can be given in the text in one or two sentences.

Discussion section presents the interpretation of the findings. This is the only proper section for subjective comments and reference to previous literature. Avoid repetition of results, do not use subheadings or reference to tables in the results section.

Bullet Points should include two headings:

- *What this paper adds and
- *Why this paper is important to paediatric dentists.
- *Provide maximum 3 bullets per heading.

Review Articles: may be invited by the Editor. Review articles for the *International Journal of Paediatric Dentistry* should include: a) description of search strategy of relevant literature (search terms and databases), b) inclusion criteria (language, type of studies i.e. randomized controlled trial or other, duration of studies and chosen endpoints, c) evaluation of papers and level of evidence. For examples see: Twetman S, Axelsson S, Dahlgren H et al. Caries-preventive effect of fluoride toothpaste: a systematic review. *Acta Odontologica Scandinavica* 2003; 61: 347-355.

Paulsson L, Bondemark L, Söderfeldt B. A systematic review of the consequences of premature birth on palatal morphology, dental occlusion, tooth-crown dimensions, and tooth maturity and eruption. *Angle Orthodontist* 2004; 74: 269-279.

Clinical Techniques: This type of publication is best suited to describe significant improvements in clinical practice such as introduction of new technology or practical approaches to recognised clinical challenges. They should conform to highest scientific and clinical practice standards.

Short Communications: Brief scientific articles or short case reports may be submitted, which should be no longer than three pages of double spaced text, and include a maximum of three illustrations. They should contain important, new, definitive information of sufficient significance to warrant publication. They should not be divided into different parts and summaries are not required.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Please also include specifications of the source of funding for the study and any potential conflict of interests if appropriate. Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

5.3. References

A maximum of 30 references should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text (Vancouver System). They should be identified in the text by bracketed Arabic numbers and listed at the end of the paper in numerical order. Identify references in text, tables and legends. Check and ensure that all listed references are cited in the text. Non-refereed material and, if possible, non-English publications should be avoided. Congress abstracts, unaccepted papers, unpublished observations, and personal communications may not be placed in the reference list. References to unpublished findings and to personal communication (provided that explicit consent has been given by the sources) may be inserted in parenthesis in the text. Journal and book references should be set out as in the following examples:

1. Kronfol NM. Perspectives on the health care system of the United Arab Emirates. *East Mediter Health J.* 1999; 5: 149-167.
2. Ministry of Health, Department of Planning. Annual Statistical Report. Abu Dhabi: Ministry of Health, 2001.
3. Al-Mughery AS, Attwood D, Blinkhorn A. Dental health of 5-year-old children in Abu Dhabi, United Arab Emirates. *Community Dent Oral Epidemiol* 1991; 19: 308-309.
4. Al-Hosani E, Rugg-Gunn A. Combination of low parental educational attainment and high parental income related to high caries experience in preschool children in Abu Dhabi. *Community Dent Oral Epidemiol* 1998; 26: 31-36.

If more than 6 authors please, cite the three first and then et al. When citing a web site, list the authors and title if known, then the URL and the date it was accessed (in parenthesis). Include among the references papers accepted but not yet published; designate the journal and add (in press). Please ensure that all journal titles are given in abbreviated form.

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here: www.endnote.com/support/enstyles.asp. Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp.

5.4. Illustrations and Tables

Tables: should be numbered consecutively with Arabic numerals and should have an explanatory title. Each table should be typed on a separate page with regard to the proportion of the printed column/page and contain only horizontal lines.

Figures and illustrations: All figures should be submitted electronically with the manuscript via ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central). Each figure should have a legend and all legends should be typed together on a separate sheet and numbered accordingly with Arabic numerals. Avoid 3-D bar charts.

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible).

For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Further information can be obtained at Wiley-Blackwell's guidelines for figures: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>. Check your electronic artwork before submitting it: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>.

Permissions: If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the publisher.